

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP05/000873

International filing date: 28 January 2005 (28.01.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: DE
Number: 10 2004 011 503.6
Filing date: 06 March 2004 (06.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 01 April 2005 (01.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen:

10 2004 011 503.6

Anmeldetag:

06. März 2004

Anmelder/Inhaber:

Immatics Biotechnologies GmbH,
72076 Tübingen/DE

Bezeichnung:

Verfahren zur Identifizierung und Quantifizierung von
tumor-assoziierten Peptiden

Priorität:

28. Januar 2004 DE 10 2004 005 273.5

IPC:

C 12 Q, A 61 K, A 61 P

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 8. März 2005
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Schäfer

WITTE, WELLER & PARTNER

Patentanwälte

Rotebühlstraße 121 D-70178 Stuttgart

Anmelder:

Immatics Biotechnologies GmbH
Auf der Morgenstelle 15
72076 Tübingen
Deutschland

06. März 2004
4648P105II - HO/HO

Verfahren zur Identifizierung und Quantifizierung von
tumor-assoziierten Peptiden

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Identifizierung und Quantifizierung und ein Verfahren zur Herstellung von tumor-assoziierten Peptiden und die so identifizierten/quantifizierten/hergestellten Peptide sowie deren Verwendung.

Derartige Peptide werden beispielsweise in der Immuntherapie von Tumorerkrankungen eingesetzt.

Bei der Eliminierung von Tumorzellen durch das Immunsystem spielt die Erkennung von tumor-assoziierten Antigenen durch

Komponenten des Immunsystems eine herausragende Rolle. Diesem Mechanismus liegt die Voraussetzung zugrunde, dass zwischen Tumorzellen und gesunden Zellen qualitative oder quantitative Unterschiede bestehen. Um eine gegen den Tumor gerichtete Antwort des Immunsystems zu erzeugen, müssen die Tumorzellen Antigene exprimieren, gegen welche eine Immunantwort hervorgerufen wird, die hinreichend für die Eliminierung des Tumors ist.

Einen großen Anteil an der Eliminierung von Tumoren haben insbesondere die CD8-exprimierenden zytotoxischen T-Lymphozyten (im Folgenden CTL). Zur Auslösung einer derartigen Immunreaktion durch CTL müssen den CTL dazu fremde Proteine/Peptide präsentiert werden. T-Zellen erkennen Antigene als Peptidfragmente nur dann, wenn diese an Zelloberflächen von MHC-Molekülen ("major histocompatibility complex") präsentiert werden. Diese MHC-Moleküle sind Peptidrezeptoren, die normalerweise Peptide innerhalb der Zelle binden, um sie zu der Zelloberfläche zu transportieren. Dieser Komplex aus Peptid und MHC-Molekül kann durch die T-Zellen erkannt werden. Die MHC-Moleküle des Menschen werden als humane Leukozytenantigene (HLA) bezeichnet.

Die Behandlung von Krebserkrankungen durch eine Immuntherapie, die antigenspezifisch ist und auf T-Zellen basiert, hat sich in der Vergangenheit als erfolgreich erwiesen.

Die Auslösung einer spezifischen CTL-Antwort, die gegen einen Tumor gerichtet ist, ist von der Identifizierung von MHC-Klasse I-Liganden abhängig, die von Tumor-assoziierten Antigenen (TAA) abstammen. Solche Tumor-assoziierten Antigene können exklusiv in malignen (bösartig veränderten) Zellen vorliegen, wie beispielsweise als Produkt mutierter Gene. Andere wichtige Klassen

Klassen von Tumor-assoziierten Antigenen sind Gewebespezifische Strukturen, wie beispielsweise die Melanozyten-Differenzierungsantigene. Eine dritte Klasse an Tumor-assoziierten Antigenen stellen Proteine dar, die in Tumoren überexprimiert werden.

Die Methoden zur Identifizierung und Charakterisierung von TAA, die den Ausgangspunkt für einen therapeutischen Impfstoff darstellen, basieren zum einen auf der Stimulation von in Patienten bereits vorhandenen CTL oder Antikörpern. Dieser immunologische Ansatz wird entweder mit einer Analyse des Genexpressionsprofils, oder mit einer massenspektrometrischen Sequenzierung der identifizierten Gene kombiniert (siehe van der Bruggen et al., 1991, A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma, Science 254:1643-1647, und Cox et al., 1994, Identification of a peptide recognized by five melanome-specific human cytotoxic T cell lines, Science 264:716-719). Methoden zur Identifizierung von TAA, welche auf der vergleichenden Analyse des Transkriptionsprofils von Tumor- und Normalgewebe basieren, sind beispielsweise der Einsatz herkömmlicher DNA-Chip-Technologie und Verfahren zur Hybridisierung von Boten-RNA aus den miteinander zu vergleichenden Gewebeproben.

Celis et al., 1994, Induction of anti-tumor cytotoxic T lymphocytes in normal humans using primary cultures and synthetic peptide epitopes, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:2105-2109, verwendeten ein Verfahren, das auf der Vorhersage von MHC-Klasse I-Liganden beruht, die von einem TAA abstammen, und bei dem anschließend diese vorhergesagten Liganden experimentell als T-Zell-Epitope bestätigt werden.

Nachteilig an diesen Vorgehensweisen, die die Verfügbarkeit von T-Zellen von Patienten notwendig voraussetzen, ist, dass die experimentelle Verwendung und Kultivierung sehr aufwändig ist.

Schirle et al., 2000, Identification of tumor-associated MHC class I ligands by a novel T-cell independent approach, Eur. J. Immunol. 30:2216-2225, beschreiben ein Verfahren, das nicht von T-Zellen abhängig ist und bei dem die Vorhersage von MHC-Klasse I-Liganden mit der gezielten Suche nach den vorhergesagten Peptid-Liganden in komplexen Peptid-Mischungen kombiniert wird, wobei die Peptide durch die Kopplung hochsensitiver kapillarer Flüssigchromatographie mit Massen-Spektroskopie (LC-MS) identifiziert wurden.

Young et al., 2001, Expression profiling of renal epithelial neoplasms: a method for tumor classification and discovery of molecular markers, Am. J. Pathol., 158:1639-1651, zeigen, dass mit Hilfe von Analysen mit DNA-Chip-Technologie eine große Anzahl von TAA aus einzelnen Tumoren identifiziert werden können. MHC-Klasse I-Liganden, die von überexprimierten, selektiv, oder exklusiv exprimierten Proteinen abstammen, stellen somit potenzielle Ziele für eine durch CTL-basierte Eliminierung von Tumoren dar. Mathiassen et al., 2001, Tumor-associated antigens identified by mRNA expression profiling induce protective anti-tumor immunity, Eur. J. Immunol. 31:1239-1246, konnten im Modell-Organismus Maus zeigen, dass es mit der Kombination von Genexpressionsanalyse und Epitopvorhersage möglich ist, einen wirksamen Impfstoff herzustellen.

Der Nachteil der Epitop-Vorhersage liegt darin begründet, dass bereits für eine geringe Anzahl an TAA eine sehr große Anzahl

von möglichen MHC-Klasse I-Liganden bestimmt wird, von denen die Mehrzahl tatsächlich gar nicht von MHC-Klasse I-Molekülen präsentiert wird, weshalb die Mehrzahl der nur vorhergesagten Epitope auch keine CTL-basierte Eliminierung von Tumoren auslösen kann.

Weinschenk et al., 2002, Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines, Cancer Res. 62:5818-5827, zeigen, dass durch die Kombination einer Genexpressionsanalyse mit den durch Flüssigchromatographie und Massenspektroskopie isolierten und analysierten MHC-Klasse I-Liganden eines Tumors in einem Verfahren gezielt Kandidaten für die Zusammenstellung eines therapeutischen Impfstoffes bestimmt werden können. Der große Vorteil gegenüber der ausschließlichen Verwendung von Genexpressionsanalyse oder Massenspektroskopie liegt darin, dass MHC-Klasse I-Liganden aus einem komplexen Peptidgemisch bestimmt werden, die aufgrund der Tatsache, dass sie sowohl tatsächlich von MHC-Klasse I-Molekülen präsentiert werden, als auch von exklusiv, selektiv, oder besonders hoch im Tumor exprimiert werdenden Genen abstammen, in besonderem Maße als immunreaktive Peptide geeignet sind.

Die Erfinder der vorliegenden Anmeldung haben nun erkannt, dass ein Nachteil des kombinierten Verfahrens aus Genexpressionsanalyse und Massenspektroskopie darin besteht, dass nicht zuverlässig Peptide indentifiziert werden, die eine CTL-Antwort auslösen, die sich gegen hoch auf dem Tumor und niedrig auf dem normalen Gewebe präsentierte MHC-Klasse I-Liganden von TAA richtet. Daher ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein neues Verfahren bereitzustellen, mit dem auf einfache Weise und gezielt immunreaktive Peptide indentifiziert werden können, die

eine CTL-Antwort auslösen, die sich gegen hoch auf dem Tumor und niedrig auf dem normalen Gewebe präsentierte MHC-Klasse I-Liganden von TAA richtet.

Die Erfinder haben erkannt, dass diese Aufgabe gelöst wird, wenn für die identifizierten Peptide das mengenmäßige Verhältnis der tatsächlich von MHC-Klasse I-Molekülen präsentiert werdenden Peptide zwischen Tumorgewebe und Normalgewebe bzw. zwischen entsprechend transfizierten oder infizierten Zellen und nicht transfizierten oder infizierten Zellen bestimmt wird.

Ein erfindungsgemäßes Verfahren zur Identifizierung und Quantifizierung von tumor-assoziierten Peptiden umfasst daher die folgenden Schritten:

Bereitstellen einer ersten Probe von Gewebe oder Zellen,

Bereitstellen einer zweiten Probe von Gewebe oder Zellen mit der gleichen Gewichtsmenge bzw. Zellzahl wie die erste Probe,

Gewinnung von Peptiden aus der ersten und der zweiten Probe,

getrennte, chemisch identische Modifizierung der Peptide aus beiden Proben zur Erzeugung unterschiedlicher physikalischer Eigenschaften bei den Peptiden aus den verschiedenen Proben,

Mischen der so modifizierten Peptide aus beiden Proben,

Bestimmung der Aminosäuresequenzen der Peptide, und

Bestimmung der relativen mengenmäßigen Verhältnisse sequenz-identischer Peptide aus den beiden Proben anhand der unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften,

wobei vorzugsweise die Peptide aus den beiden Proben unter Verwendung von mindestens zwei verschiedenen stabilen Isotopen des selben Elements chemisch modifiziert werden.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß also gelöst durch ein Verfahren zur Identifizierung und Quantifizierung von tumor-assoziierten Peptiden, bei dem zunächst mindestens zwei verschiedene Quellen (Tumor- und Normalgewebe oder entsprechend transfizierte Zelllinien) gleicher Gewichtsmenge oder Zellzahl zur Gewinnung der Peptide bereitgestellt werden und die Peptide dann aus den unterschiedlichen Quellen unter Verwendung mindestens zwei verschiedener stabiler Isotope desselben Elements getrennt voneinander in identischer Weise chemisch modifiziert werden, die so modifizierten Peptide dann gemischt und danach vorzugsweise durch chromatographische Verfahren isoliert sowie die Aminosäuresequenzen der Peptide bestimmt werden, wobei die Bestimmung der relativen mengenmäßigen Verhältnisse sequenz-identischer Peptide aus verschiedenen Proben zueinander anhand der verwendeten stabilen Isotope in der chemischen Modifikation erfolgt.

Die Peptide werden dabei nach Standardprotokollen isoliert, bspw. unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers wie z.B. des W6/32, der spezifisch für HLA-Klasse-I-Moleküle ist.

Um sicherzustellen, dass aus beiden Quellen Ausgangsmaterial gleicher Menge (Gewicht bei Gewebe) oder Zellzahl verwendet

wird, kann auch eine Normalisierung über beispielsweise ein in Tumor- und Normalgewebe gleichermaßen vorkommendes Peptid oder einen sonstigen Marker erfolgen.

Des Weiteren betrifft die Erfindung nach dem neuen Verfahren identifizierte Peptide sowie ein tumor-assoziiertes Peptid mit einer Aminosäuresequenz, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus SEQ-ID Nr. 1 bis 36 aus dem beiliegenden Sequenzprotokoll, wobei das Peptid die Fähigkeit aufweist, an ein Molekül des menschlichen Haupthistokompatibilitäts-Komplexes (MHC) Klasse-I zu binden.

Die Erfindung betrifft darüber hinaus die Verwendung der Peptide oder der für die Peptide kodierenden Nukleinsäuremoleküle zur Herstellung eines Arzneimittels und zur Behandlung von Tumorerkrankungen und/oder adenomatöser Erkrankungen.

Ein erfindungsgemäßes Verfahren zur Identifizierung und Quantifizierung von tumor-assoziierten Peptiden umfasst die folgenden Schritte:

- a) Bereitstellung einer Probe aus tumorösem und einer Probe aus korrespondierendem gesunden Gewebe oder entsprechend transfizierten bzw. infizierten Zelllinien, wobei beide Proben gleiche Gewichtsmengen oder Zellzahlen aufweisen,
- b) Isolation von Peptiden aus der Probe aus tumorösem Gewebe,

- c) Isolation von Peptiden aus der Probe aus korrespondierendem gesunden Gewebe,
- d) Chemische Veränderung der aus Schritt (b) gewonnenen Peptide mit einer chemischen Gruppe, die ein stabiles Isotop eines Elements aus dem Periodensystem der Elemente enthält (beispielsweise Deuterium, ^2D),
- e) Chemische Veränderung der aus Schritt (c) gewonnenen Peptide mit einer chemischen Gruppe, die ein zweites stabiles Isotop des in Schritt d) verwendeten Elementes aus dem Periodensystem der Elemente enthält (beispielsweise normaler Wasserstoff, ^1H),
- f) Mischung der aus den Schritten (d) und (e) gewonnenen, chemisch modifizierten Peptide,
- g) Trennung der aus Schritt f) gewonnenen Peptide durch chromatographische Verfahren,
- h) Identifizierung und Bestimmung von Peptiden mit identischen Aminosäuresequenzen und der mengenmäßigen Verhältnisse von chemisch veränderten Peptiden mit identischen Aminosäuresequenzen aus Schritt (g),
- i) Identifizierung von tumor-assoziierten Peptiden mit Eignung, vorzugsweise herausragender Eignung für die Zusammenstellung eines therapeutischen

Impfstoffes auf Grundlage der aus Schritt (h) gewonnenen Daten.

Die Erfinder haben erkannt, dass durch das vorzugsweise auf Massenspektroskopie und auf differentieller chemischer Veränderung basierende Verfahren zur Bestimmung der Unterschiede in den mengenmäßigen Verhältnissen von Peptiden zwischen Tumorgewebe und Normalgewebe, besonders für die Zusammenstellung therapeutischer Impfstoffe geeignete Peptide identifiziert werden können.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist es daher möglich, Peptide zu identifizieren, die für die individuelle Zusammenstellung beispielsweise eines personalisierten Gemischs an tumorassoziierten Peptiden für einen einzelnen Patienten geeignet sind, wobei die Peptide dann eine gezielte, dem individuellen Bedarf eines Patienten angepasste CTL-Antwort auslösen können.

Dieses Verfahren kann – nach Erhalt von Patientenproben – systematisch und effizient beispielsweise von Großlabors durchgeführt werden, die nach erfolgter Identifizierung geeigneter Peptide deren Sequenzen an die behandelnden Kliniken weitergeben, wo die Peptide dann synthetisiert und als therapeutischer Impfstoff formuliert werden können. Es ist aber auch möglich, dass ein Labor sowohl die Identifizierung, als auch die arzneimittelgerechte Herstellung, Formulierung und Bereitstellung der für den jeweiligen Patienten geeigneten tumorassoziierten Peptide durchführt.

Auch kann die systematische und häufige Anwendung des Verfahrens zu einer kommerziellen Verwertung von geeigneten tumor-

assoziierten Peptiden, die besonders häufig als MHC-Klasse I-Liganden gefunden werden, als Fertigarzneimitteln führen.

Das neue Verfahren ist also sowohl im Rahmen einer reinen Dienstleistung, als auch in Verbindung mit der Herstellung, Formulierung und Bereitstellung, sowohl für einen einzelnen Patienten, als auch im für die Verwertung durch Unternehmen der pharmazeutischen Industrie geeigneten, industriellen Maßstab, anwendbar.

In einer bevorzugten Ausführungsform sind die in den Schritten (b) und (c) isolierten Peptide MHC-Klasse I-Liganden.

Nur an MHC-Moleküle gebundene Peptide können eine CTL-Immunreaktion auslösen. Peptide, die beispielsweise von überexprimierten Genen in einem Tumor abstammen, aber nicht an MHC-Moleküle gebunden sind, lösen keine CTL-Immunreaktion aus. Daher sind nicht alle, z.B. lediglich durch Vorhersage von Epitopen bestimmten Peptide, tatsächlich zur Auslösung einer Immunreaktion geeignet.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird der Schritt (d) mittels der Guadinylierung der ϵ -Aminogruppe eines Lysinrestes eines Peptides durch chemische Reaktion von Peptiden mit O-Methyl Iso-Harnstoff-Hemisulfat und der Nikotinylierung der α -Aminogruppe durch chemische Reaktion von Peptiden mit 2D_4 -Nicotiny-Amino-Hydroxy-Succinimid (2D_4 -NicNHS) durchgeführt. Die Guadinylierung der ϵ -Aminogruppe der Lysinreste von Peptiden ist beispielsweise beschrieben in Beardsley et al., 2002, Optimization of guadination procedures for MALDI mass mapping, Anal. Chem. 74:1884-1890. Die Nikotinylierung der α -Aminogruppe

von Peptiden ist beispielsweise beschrieben in Munchbach et al., 2000, Quantitation and facilitated de novo sequencing of proteins by isotopic N-terminal labeling of peptides with a fragmentation-directing moiety, Anal. Chem. 72:4047-4057.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird der Schritt (e) mittels der Guadinylierung der ϵ -Aminogruppe eines Lysinrestes eines Peptides durch chemische Reaktion von Peptiden mit O-Methyl Iso-Harnstoff-Hemisulfat und der Nikotinylierung der α -Aminogruppe durch chemische Reaktion von Peptiden mit $^1\text{H}_4$ -Nicotinyl-Amino-Hydroxy-Succinimid ($^1\text{H}_4$ -NicNHS) durchgeführt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird in den Schritten (g) und (h) die Analyse mittels eines gekoppelten Flüssigchromatographie- und Massenspektroskopie-Verfahrens durchgeführt. Mittels dieser Technik können die einzelnen chemisch modifizierten Peptide genau und effizient und mit hohem Durchsatz bestimmt werden. Die Anwendung der Massenspektroskopie zur Bestimmung von chemisch modifizierten Peptiden ist beispielsweise beschrieben in Munchbach et al., 2000, Quantitation and facilitated de novo sequencing of proteins by isotopic N-terminal labeling of peptides with a fragmentation-directing moiety, Anal. Chem. 72:4047-4057. Die Identifizierung von Peptiden aus Tumorgewebe ist beispielsweise beschrieben in Weinschenk et al., 2002, Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines, Cancer Res. 62:5818-5827.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird nach Schritt (h) ein weiterer Schritt durchgeführt, bei dem die Reaktivität von Leukozyten aus dem peripheren Blut, vorzugsweise T-Lympho-

zyten, gegen die durch Schritt (h) definierten Peptide getestet wird.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Reaktivität von peripheren Leukozyten gegen die durch Schritt (h) definierten Peptide über die Messung der von den Leukozyten gebildeten γ -Interferon-mRNA und/oder Zytokin-mRNA getestet.

Durch den Nachweis von γ -Interferon-mRNA und/oder Zytokin-mRNA ist es möglich, die spezifische Reaktivität von Leukozyten, vorzugsweise von T-Lymphozyten, gegenüber den antigenen Peptiden genau nachzuweisen. Die beiden Stoffe werden von aktivierten T-Lymphozyten nach ihrer Aktivierung durch korrespondierende Peptide, die auf Zelloberflächen an MHC-Moleküle gebunden vorliegen, sekretiert. Dieser zusätzliche Schritt bietet die Möglichkeit, noch gezielter Kandidaten aus den bereits identifizierten Peptiden zu identifizieren.

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens wird nach Schritt (h) ein weiterer Schritt durchgeführt, bei dem die Existenz spezifischer T-Lymphozyten nachgewiesen wird.

Mit diesem Verfahren ist es möglich, spezifisch herauszufinden, inwieweit und in welchem Umfang im Patienten bereits T-Lymphozyten gegen die isolierten und die identifizierten Peptide vorliegen. Durch diesen Schritt ist es möglich, auch nur diejenigen Peptide als therapeutischen Impfstoff einzusetzen, für die bereits T-Lymphozyten im Patienten vorliegen. Die Peptide können dann dazu eingesetzt werden, diese spezifischen T-Lymphozyten zu aktivieren.

In einem weiteren bevorzugten Verfahren erfolgt der Nachweis der Existenz spezifischer T-Lymphozyten über die Markierung der Leukozyten mit rekonstituierten Komplexen aus MHC-Molekülen und antigenem Peptid.

Bei diesem Verfahren wird die sogenannte Tetramer-Technologie eingesetzt. Die Gewinnung solcher rekonstituierten Komplexe ("Tetramere") und deren Einsatz ist beispielsweise beschrieben in Altman et al., 1996, Phenotypic analysis of antigen-specific T-lymphocytes, Science 274:94-96.

In einem weiteren bevorzugten Verfahren werden spezifische T-Lymphozyten aus peripherem Blut von Patienten mit rekonstituierten Komplexen aus MHC-Molekülen und antigenen Peptiden, die gemeinsam mit dem Molekül CD28 an eine synthetische Oberfläche gebunden sind, aktiviert. Dieses Verfahren ist beispielsweise beschrieben in Walter et al., 2003, Cutting Edge: predetermined avidity of human CD8 T cells expanded on calibrated MHC/anti-CD28-coated microspheres, J. Immunol. 171:4974-4979.

Die Erfindung betrifft in einem weiteren Aspekt immunreaktive Peptide, die durch das erfindungsgemäße Verfahren identifiziert und/oder hergestellt werden.

Diese Peptide können nach Identifizierung gezielt und spezifisch hergestellt werden, also chemisch, in vitro oder in vivo synthetisiert werden.

Es versteht sich, dass dabei zumindest eine Aminosäure durch eine andere Aminosäure mit ähnlichen chemischen Eigenschaften

ersetzt werden kann, N- oder C-terminal zumindest eine weitere Aminosäure vorhanden sein kann, zumindest eine Aminosäure deletiert sein kann, und/oder zumindest eine Aminosäure chemisch modifiziert sein kann, ohne dass die immunreaktiven Eigenschaften des Peptides verloren gehen.

Die Erfindung betrifft weiterhin eine pharmazeutische Zusammensetzung, die eines oder mehrere der Peptide enthält, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren identifiziert und/oder hergestellt wurden.

Diese Zusammensetzung dient beispielsweise der parenteralen Verabreichung beispielsweise durch subkutane, intradermale oder intramuskuläre Verabreichung. Dabei sind die Peptide in einem pharmazeutischen Träger gelöst oder suspendiert, darüber hinaus kann die Zusammensetzung Hilfsstoffe, wie beispielsweise Puffer, Bindemittel, Verbindungsmittel, etc. enthalten. Eine umfassende Darstellung von Hilfsstoffen, wie sie bei einer derartigen Zusammensetzung verwendet werden können, ist beispielsweise beschrieben in A. Kibbe, 2000, Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3. Ed., American Pharmaceutical Association and Pharmaceutical Press. Die Peptide können auch zusammen mit immunstimulierenden Substanzen, wie beispielsweise Zytokinen verabreicht werden. Eine umfassende Darstellung von immunstimulierenden Substanzen, wie sie zusammen mit Peptiden verabreicht werden können, ist beispielsweise beschrieben in Ribas et al., 2003, Current developments in cancer vaccines and cellular immunotherapy, J. Clin. Oncol. 21:2415-2432.

Erfindungsgemäß können die Peptide zur Behandlung von Tumorerkrankungen und zur Herstellung eines Mittels zur Behandlung von Tumorerkrankungen verwendet werden.

Die zu behandelnden Tumorerkrankungen umfassen dabei Nieren-, Lungen-, Darm-, Magen-, Pankreas-, Brust-, Prostata-, Ovarial- und/oder Hautkrebs. Die Aufzählung der Tumorerkrankungen ist dabei lediglich beispielhaft und soll den Verwendungsbereich nicht eingrenzen.

Ferner können die Peptide auch zur Beurteilung eines Therapieverlaufs bei Tumorerkrankungen eingesetzt werden.

Auch bei anderen Impfungen oder Therapien können Peptide für die Beurteilung eines Behandlungsverlaufes eingesetzt werden. Somit sind die erfindungsgemäßen Peptide nicht nur therapeutisch, sondern auch diagnostisch einsetzbar.

In einer weiteren Ausführungsform werden die Peptide zur Herstellung von Antikörpern eingesetzt.

Polyklonale Antikörper können in herkömmlicher Weise durch Immunisierung von Tieren mittels Injektion der Peptide und anschließender Aufreinigung der Immunglobuline aus dem Blut der immunisierten Tiere gewonnen werden.

Monoklonale Antikörper können nach Standardprotokollen hergestellt werden, wie beispielsweise in Methods Enzymol., 1986, Hybridoma technology and monoclonal antibodies, 121:1-947, beschrieben.

Bispezifische monoklonale Antikörper können nach Standardprotokollen hergestellt werden, wie beispielsweise Tomlinson et al., 2000, Methods for generating multivalent and bispecific antibody fragments, Methods Enzymol. 346:461-479.

Die Erfindung betrifft in einem weiteren Aspekt Nukleinsäuremoleküle, die für das mit dem erfindungsgemäßen Verfahren isolierte Peptid kodieren.

Die Nukleinsäuremoleküle können dabei DNA- oder RNA-Moleküle sein und gegebenenfalls auch für die Immuntherapie von Krebserkrankungen eingesetzt werden.

Erfindungsgemäß können die Nukleinsäuremoleküle auch in einem Vektor vorliegen.

Weiterhin betrifft die Erfindung eine Zelle, die mit Hilfe des Nukleinsäuremoleküls genetisch so verändert wurde, dass sie ein erfindungsgemäß identifiziertes Peptid produzieren.

Diese Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Herstellung eines tumor-assoziierten Peptids, bei dem nach dem beschriebenen Verfahren ein Peptid identifiziert und das identifizierte Peptid chemisch, in vitro oder in vivo synthetisiert wird.

Peptide können durch chemische Reaktion von Aminosäuren beispielsweise durch das Verfahren nach Merrifield hergestellt werden, das in Merrifield, 1963, J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2154 beschrieben ist.

In vitro lassen sich Peptide beispielsweise in zellfreien Expressionssystemen herstellen, in vivo können Peptide in prokaryotischen und eukaryotischen Zellen hergestellt werden.

Eine bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines Impfstoffes mit den Schritten

- (a) Durchführung des oben beschriebenen Verfahrens,
- (b) Herstellung der in Schritt (i) identifizierten tumorassoziierten Peptide und
- (c) Formulierung der in Schritt (j) hergestellten tumorassoziierten Peptide.

Die Erfindung betrifft ferner ein diagnostisches Verfahren bei dem das neue Verfahren durchgeführt und das Vorhandensein und/oder das mengenmäßige Verhältnis eines Peptides als diagnostischer Marker verwendet wird, ein Verfahren zur Behandlung eines pathologischen Zustandes, bei dem eine Immunantwort gegen ein interessierendes Protein ausgelöst wird, wobei eine therapeutische wirksame Menge zumindest eines der nach dem neuen Verfahren gefundenen Peptide verabreicht wird, sowie ein elektronisches Speichermedium, das die Aminosäuresequenz zumindest eines der erfindungsgemäßen Peptide und/oder die Nukleinsäuresequenz eines für ein erfindungsgemäßes Peptid kodierenden Nukleinsäuremoleküls enthält.

Es versteht sich, dass die vorstehend genannten und die nachstehend noch zu erläuternden Merkmale nicht nur in der jeweils angegebenen Kombination, sondern auch in anderen Kombinationen oder in Alleinstellung verwendbar sind, ohne den Rahmen der vorliegenden Erfindung zu verlassen.

Ausführungsbeispiele der Erfindung werden nachfolgend in den Figuren und dem Beispiel dargestellt und erläutert. Es zeigen:

Fig. 1 eine Übersicht über das erfindungsgemäße Verfahren zur Identifizierung und Quantifizierung von tumorassoziierten Peptiden;

Fig. 2 die massenspektroskopische Auswertung von (A) nicht-modifizierten und (B) $^1\text{H}_3/{}^2\text{D}_3$ -acetylierten Peptiden. (C) Massenspektroskopische Auswertung eines Peptidgemisches, das beispielhaft sowohl das nicht-modifizierte Peptid, das $^1\text{H}_3$ -acetylierte Peptid und ${}^2\text{D}_3$ -acetylierte Peptide mit der Aminosäuresequenz EVNGLISMY enthält; (D) erläutert die in Fig. 2 verwendete Nomenklatur;

Fig. 3 eine vergleichende Quantifizierung von antigenen Peptiden aus zwei verschiedenen Quellen, wobei in (A) eine massenspektroskopische Auswertung der relativen mengenmäßigen Verhältnisse von drei verschiedenen Peptiden aus zwei Gewebeproben (Darmkrebsprobe, Probe gesunden Gewebes vom selben Patienten) abgebildet ist. Die aus der Darmkrebsprobe isolierten Peptide wurden ${}^2\text{D}_3$ -acetyliert. Die aus der Probe gesunden Gewebes isolierten Peptide wurden $^1\text{H}_3$ -acetyliert. (B)

zeigt eine massenspektroskopische Auswertung von drei verschiedenen Peptiden aus $^1\text{H}_4$ -nicotinylierten/guadinylierten Awells-Zellen und mit Keratin 18-transfizierten und $^2\text{D}_4$ - nicotinylierten/guadinylierten Awells-Zellen. (C) zeigt die Bestimmung der Aminosäuresequenzen eines $^1\text{H}_3$ -acetylierten Peptides mit der Aminosäuresequenz DAAHPTNVQR und eines $^2\text{D}_3$ -acetylierten Peptides mit der Aminosäuresequenz DAAHPTNVQR durch Fragmentierung;

Fig. 4

Ausbeuten von in verschiedenen Weisen chemisch modifizierten Peptiden. Vier Peptide mit den Aminosäuresequenzen AETSYVKVL, KLSLGLPGL, SLGLQLAKV und VLDPRGIYL wurden in einer Mischung zu äquimolaren Anteilen eingesetzt und anschließend zum Zweck der vergleichenden Untersuchung dreier Vorgehensweisen zur chemischen Modifizierung entweder acetyliert, oder acetyliert und guanidinyliert, oder guanidinyliert und nicotinyliert. Nach Abschluss der chemischen Reaktion zur Modifikation der Referenzpeptide wurden diese mit den eingangs verwendeten, nicht modifizierten Peptiden gemischt, um im anschließenden analytischen Schritt einen Vergleich zu ermöglichen. Die vergleichende Auswertung wurde durch Analyse mit Nano-Electrospray-Ionisierungs-Massenspektrometrie (nano-ESI-MS) durchgeführt.

Versuchsdurchführungen

Patientenprobe

Von der Abteilung für allgemeine Chirurgie des Universitätsklinikums der Universität Tübingen wurde eine Probe von einem Patienten erhalten, der histologisch bestätigten Darmkrebs aufwies. Der Patient (im Folgenden mit CCA129 bezeichnet) besaß den HLA-Klasse-I-Typus HLA-A*01, HLA-A*68, HLA-B*08, HLA-B*44.

Zelllinie

Es wurde die Zelllinie Awells verwendet (European Collection of Cell Cultures, Porton Down, Salisbury, Vereinigtes Königreich), die den HLA-Klasse-I-Typus HLA-A*02, HLA-B*44 besitzt.

Keratin 18-transfizierte Zelllinie

Die Zelllinie Awells wurde mit der DNA-Sequenz für humanes Keratin 18 nach Standardprotokollen stabil transfiziert. Hierzu wurde die für humanes Keratin 18 kodierende cDNA unter Verwendung des TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) subkloniert. Die anschließende Klonierung erfolgte zwischen den Restriktions-Endonuklease-Schnittstellen EcoR I und Not I des Plasmidvektors pcDNA3-Ii im Leseraster der Ii-Sequenz. Die Transfektion der Awells-Zellen wurde vermitteltst Elektroporation durchgeführt, wonach stabile Transfektanten ausgewählt und in Kultur gehalten wurden.

Isolierung der HLA-Klasse-I-gebundenen Peptide

Die Aufbereitung der nach chirurgischer Entfernung in flüssigem Stickstoff schockgefrorenen Gewebsprobe wurde wie bereits beschrieben in Schirle et al., Identification of tumor-associated MHC class I ligands by a novel T cell independent approach, 2000, European Journal of Immunology, 30:2216-2225, durchgeführt. Die Peptide wurden nach Standardprotokollen isoliert, und zwar unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers W6/32, der spezifisch für HLA-Klasse-I-Moleküle ist. Barnstable et al., Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens - new tools for genetic analysis, 1978, Cell, 14:9-20, beschreibt die Herstellung und Anwendung dieses Antikörpers.

Acetylierung von Peptiden

10 μ l $^1\text{H}_6$ -acetyl-Anhydrid oder $^2\text{D}_6$ -acetyl-Anhydrid (50%ige Lösung nach Volumen in Methanol) wurden zu 100 μ l Peptidgemisch (Peptid-Mengen in Gemischen: zwischen 2 nmol und 200 pmol) in einem 50%igen Methanol/Wasser-Gemisch (nach Volumen) gegeben. Die chemische Reaktion erfolgte über 15 Minuten bei Raumtemperatur. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1.1 μ l Ameisensäure gestoppt. Anschließend wurden gleiche Volumina aus beiden Ansätzen entnommen und miteinander gemischt.

Guadinylierung von Petiden

Peptidgemische aus Tumorgewebe (CCA129), oder Keratin-18-transfizierten- oder nicht-transfizierten Awells-Zellen (Peptid-Mengen in Gemischen: zwischen 2 nmol und 200 pmol) in

Citrat-Puffer (50 mM Citrat, pH 3.0) wurden mit 0.25 % Trifluor-Essigsäure (TFA, nach Volumen) versetzt, anschließend wurde der pH des Gemisches mit 200 μ l Natriumhydroxid (10 M Lösung) auf 10.5 eingestellt. Nach Zugabe von 1 ml O-methyl-iso-Harnstoff-Hemisulfat-Lösung (2.5 M in Wasser) wurde das Reaktionsgemisch für 10 Minuten bei 65°C (Wasserbad) inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200 μ l Ameisensäure gestoppt.

Nikotinylierung von guadinylierten Peptiden

Die durch Guadinylierung chemisch modifizierten Peptidgemische aus Tumorgewebe (CCA129), oder Keratin-18-transfizierten- oder nicht-transfizierten Awells-Zellen wurden auf eine Chromatographiesäule des Typs "reversed phase C-18 microcolumn" (Agilent Technologies hydrophobic XGSXB) aufgetragen und mit 0.5 ml Wasser gewaschen. An das Säulenmaterial gebundene Peptide wurden anschließend auf der Säule belassen und durch langsames Auftragen von 1 ml frisch hergestelltem $^1\text{H}_4$ - oder $^2\text{D}_4$ -Nikotinyln-N-Hydroxysuccinimid-Ester (Natriumphosphatpuffer 50 mM; pH 8.5) durch chemische Reaktion bei Raumtemperatur nikotinyliert. Im Anschluss wird ein zweites Mal 1 ml frisch hergestellter $^1\text{H}_4$ - oder $^2\text{D}_4$ -Nikotinyln-N-Hydroxysuccinimid-Ester langsam durch die mit dem Peptidgemisch beladene Chromatographie-Säule geleitet. Daraufhin wird Hydroxylamin durch die Säule geleitet, um unerwünschte Modifizierungen von Tyrosin-Resten durch Nikotinyln-Gruppen wieder zu entfernen. Abschließend wird die Chromatographie-Säule mit Wasser gewaschen, bevor die Peptide mit 100 μ l eines 50%igen Acetonitril/Wasser-Gemisches (nach Volumen) von der Säule eluiert werden.

Offline-High Performance Liquid Chromatography- (HPLC-) Auftrennung von Peptidgemischen

Gemische derart chemisch modifizierter Peptide wurden in äquimolaren Verhältnissen gemischt und im Volumen auf ca. 100 μ l durch Vakuum-Zentrifugation eingeeengt. Die eingeeengten Gemische wurden mit 400 μ l Wasser mit 0.08 % TFA (nach Volumen) verdünnt, bevor sie durch automatische Probeninjektion auf eine an ein SMART-HPLC-System (Amersham-Pharmacia, Freiburg, Deutschland) angeschlossene "reversed phase"-Chromatographie-Säule des Typs μ RP SC C2/C18, 100 mm x 2.1 mm, Amersham-Pharmacia, Freiburg, Deutschland) aufgetragen wurden. Zur chromatographischen Auftrennung und der Elution der an das Säulenmaterial gebundenen Peptide wurde ein binärer Gradient aus zwei Lösungsmittelgemischen A und B verwendet. Lösungsmittelgemisch A enthält 0.1 % TFA (nach Volumen) in Wasser. Lösungsmittelgemisch B enthält 0.08 % TFA und 80 % Acetonitril (beides nach Volumen) in Wasser. Der binäre Gradient beginnt mit 90 % Lösungsmittelgemisch A und 10 % Lösungsmittelgemisch B und nimmt einen linearen Verlauf bis zu einem Mischungsverhältnis von 40 % Lösungsmittelgemisch A und 60 % Lösungsmittelgemisch B. Das Eluat wird in Fraktionen mit Volumina von jeweils 150 μ l pro Fraktion gesammelt. Vor Beginn der massenspektrometrischen Untersuchungen der chromatographisch aufgetrennten Peptide werden die gesammelten Fraktionen durch Vakuum-Zentrifugation vollständig getrocknet und anschließend in einem Gemisch aus 50 % Methanol, 49.9 % Wasser und 0.1 % Ameisensäure erneut gelöst.

Mikrokapillar-Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie

Diese Peptidgemische wurden mit Hilfe eines an ein mit einer mikro-Elektrospray-Ionisationsquelle ausgestatteten Hybrid-Quadropol-Massenspektrometriegerät ("orthogonal acceleration time of flight mass spectrometer", Micromass, Manchester, Vereinigtes Königreich) angeschlossenen reversed-phase-HPLC-Systems ("reversed phase Ultimate HPLC System, Dionex, Amsterdam, Niederlande) analysiert. Dazu wird das Probenmaterial zuallererst auf einer C18-Vorsäule mit den Maßen 300 μm x 5 mm (LC Packings, Amsterdam, Niederlande) entsalzt und vorkonzentriert. Das Lösungsmittel und die Probe wurden mittels einer Spritzenpumpe (Harvard Apparatur, Inc.) mit einer abgedichteten 100 μl -Spritze (1710 RNR, Hamilton) mit einer Geschwindigkeit von 2 μl pro Minute zugeführt. Die mit dem Peptid-Gemisch beladene Vorsäule wird anschließend in Flussrichtung vor eine an das "reversed phase Ultimate"-HPLC-System angeschlossene, mit C18-reversed-phase Material (5 μm , Dionex, Amsterdam, Niederlande) beladene Silica-Säule (75 μm x 250 mm, Dionex, Amsterdam, Niederlande) geschaltet. Zur Elution der gebundenen Peptide wird über einen Zeitraum von 120 Minuten ein binärer Gradient angelegt, der mit 15 % Lösungsmittel A (4 mM Ammoniumacetat in Wasser, pH 3.0) und 85 % Lösungsmittel B (2 mM Ammoniumacetat in einem Gemisch nach Volumen aus 80 % Acetonitril und 20 % Wasser, pH 3.0) beginnt und bis zu einem Mischungsverhältnis von 40 % Lösungsmittel A und 60 % Lösungsmittel B führt. Die Durchflussgeschwindigkeit während der Elution der Peptide wird durch das Ultimate split-System (Dionex, Amsterdam, Niederlande) auf ca. 300 μl pro Minute reduziert. Das Eluat wurde durch eine goldbeschichtete Glaskapillare (PicoTip, New Objective, Cambridge/Massachusetts, U.S.A.) in die mikro-ESI-Quelle eingeführt. Die Integrationszeit für die "time of flight"-Analyse (TOF Analyzer) wurde auf 1 Sekunde festgelegt, die zwischen

zwei Analysevorgängen liegende Verzögerungszeit betrug 1/10 Sekunde. Das Verhältnis von chemisch modifizierten Peptiden mit Deuterium- (^2D -) Atomen zu Peptiden der gleichen zugrunde liegenden Aminosäuresequenz mit normalen Wasserstoff- (^1H -) Atomen wurde durch Vergleiche der relativen Höhe der "peaks" (gemessene Scheitelpunkte der aus der massenspektrometrischen Analyse hervorgehenden Signale) bestimmt.

Die Online-Fragmentierung von Peptiden zur Bestimmung der Aminosäuresequenz (HPLC-MSMS) wurde mit einer Integrationszeit für die "time of flight"-Analyse (TOF Analyzer) von 4 Sekunden und einer zwischen zwei Analysevorgängen liegenden Verzögerungszeit von 1/10 Sekunde und ansonsten wie beschrieben durchgeführt. Während des Vorgangs der Online-Fragmentierung der $[\text{M}+\text{H}]^+$ und $[\text{M}+\text{H}]^{2+}$ -Ionen wird automatisch zwischen dem HPLC-MS- und dem HPLC-MSMS-Modus gewechselt. Die aus den massenspektrometrischen Analysen hervorgehenden Spektren wurden manuell analysiert. Als Datenbanken wurden NCBI nr und EST unter Verwendung von MASCOT (<http://www.matrixscience.com>) benutzt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführung können für kleine Probenvolumina anstelle eines HPLC-Systems zur weiteren Reduktion der Durchflussrate für den Probenauftrag auf die mikro-ESI-Quelle auch metallbeschichtete Glaskapillaren (Proxeon, Odense, Dänemark) verwendet werden. Dadurch werden Flussraten von 20 nl pro Minute bis 50 nl pro Minute möglich. In dieser Ausführungsform wird das Verhältnis von chemisch modifizierten Peptiden mit Deuterium- (^2D -) Atomen zu Peptiden der gleichen zugrunde liegenden Aminosäuresequenz mit normalen Wasserstoff- (^1H -) Atomen durch Vergleiche der relativen Höhe der "peaks" (gemessene Scheitelpunkte der aus der massenspektrometrischen

Analyse hervorgehenden Signale) und der relativen mathematisch integrierten Flächen der "peaks" bestimmt. Auch in dieser Ausführungsform ist die Fragmentierung von Peptiden im HPLC-MSMS-Modus möglich. Diese wird mit Kollisionsenergien von 30-60 eV für $[M+H]^+$ -ionisierte Fragmente und 20-30 eV für $[M+H]^{2+}$ -ionisierte Fragmente durchgeführt. Für diese Ausführungsform beträgt die Integrationszeit für die "time of flight"-Analyse (TOF Analyzer) 1 Sekunde, und zwischen zwei Analysevorgängen liegt eine Verzögerungszeit von 1/10 Sekunde.

Ergebnisse

Fig. 1 stellt das Grundprinzip der differenziellen Bestimmung und Identifizierung von MHC-Klasse-I-gebundenen Peptiden dar. In diesem Verfahren werden Peptide aus zwei verschiedenen Quellen mit reaktiven chemischen Gruppen behandelt, die sich anhand von der Gegenwart oder Abwesenheit von bestimmten Wasserstoff-Spezies (leichter Wasserstoff: 1H ; schwerer Wasserstoff: 2D) unterscheiden lassen, ohne dass die durch die unterschiedlichen Wasserstoff-Isotope erreichten, zur Abgrenzung verwendeten physikalischen Eigenschaften einen messbaren Einfluss auf die chemischen Eigenschaften der modifizierten Peptide aufweisen. Die durch die chemische Modifikation entstehenden Peptid-Derivate werden miteinander kombiniert, also gemischt bzw. vereinigt, und durch Chromatographie ("offline"-HPLC oder "online"-HPLC-MS) entsprechend ihrer durch die primäre Aminosäureabfolge begründete Hydrophobizität, respektive Hydrophilität, getrennt. Die Signalintensität der durch anschließende massenspektrometrische Analyse ermittelten spezifischen Masse/Ladungs-Signale ist der Gradmesser für das relative mengenmäßige Verhältnis zwischen Peptiden mit der gleichen

zugrunde liegenden primären Aminosäuresequenz, die aus unterschiedlichen Quellen gewonnen worden waren. Die Anwendung des Tandem-MSMS-Verfahrens liefert unter Verwendung von Datenbanken zusätzlich Information über die im Einzelfall vorliegende Aminosäuresequenz der Peptide.

Die Acetylierung von MHC-Klasse-I-Liganden stellt eine schnelle und einfache Methode zur chemischen Modifikation von Peptiden dar. Die Acetylierung von Peptiden wurde experimentell unter Verwendung von synthetischen Peptidgemischen optimiert. Die Peptide waren nach 15 Minuten Reaktionszeit (wie beschrieben) vollständig am amino-terminalen Ende acetyliert.

Die Verwendung von $^2\text{D}_6$ - und $^1\text{H}_6$ -Acetanhydrid für die Acetylierung ermöglicht die differenzielle Quantifizierung von Peptiden.

MHC-Klasse-I-gebundene Peptide wurden zur Demonstration der Machbarkeit wie beschrieben von MGAR-Zellen gewonnen, in zwei gleichvolumige Teilproben getrennt und wie beschrieben mit $^2\text{D}_6$ -, respektive $^1\text{H}_6$ -Acetanhydrid acetyliert. Nach Beendigung der chemischen Reaktion wurden die Teilproben erneut in äquimolaren Verhältnissen gemischt und die relativen Verhältnisse zwischen $^2\text{D}_3$ - und $^1\text{H}_3$ -acetylierten Peptiden bestimmt. Fig. 2 zeigt beispielhaft die $^2\text{D}_3$ - und $^1\text{H}_3$ -Varianten eines Peptids mit der Aminosäuresequenz EVNGLISMY (Molekulargewicht ohne chemische Modifikation: 1040.5 Da). Das Peptid EVNGLISMY stellt ein Fragment aus dem "U5 snRNP-spezifischen Protein" dar. Das gemessene relative Verhältnis zwischen $^2\text{D}_3$ - und $^1\text{H}_3$ -Varianten ($^2\text{D}_3/{}^1\text{H}_3$ -Ratio) von EVNGLISMY betrug 1.0. Für 15 weitere Peptide, die von den selben MGAR-Zellen eluiert und als einfach oder zweifach geladene Ionen massenspektrometrisch detektiert worden

waren, betrug die $^2\text{D}_3/^1\text{H}_3$ -Ratio im arithmetischen Mittel 1.01. Die Standardabweichung (SD) betrug ± 0.13 (Tabelle 1). Neben der Ermöglichung einer Bestimmung der relativen Anteile von Peptiden mit gleicher zugrunde liegender Aminosäuresequenz aus zwei oder mehreren unterschiedlichen Quellen führt die Acetylierung von Peptiden durch die Verschiebung der b-Serien-Ionen um 3 Da von $^2\text{D}_3$ -acetylierten gegenüber $^1\text{H}_3$ -acetylierten Peptiden auch zu einer Vereinfachung der Auswertung der korrespondierenden Massenspektrogramme (Fig. 2C). b-Serien-Ionen sind im allgemeinen ionisierte Fragmente sowohl chemisch modifizierter-, als auch nicht-modifizierter Peptide, die mindestens den in der Aminosäureprimärsequenz am Aminoterminal gelegenen Aminosäurerest enthalten. y-Serien-Ionen sind im Gegensatz zu den b-Serien-Ionen im allgemeinen ionisierte Fragmente sowohl chemisch modifizierter-, als auch nicht-modifizierter Peptide, die mindestens den in der Aminosäureprimärsequenz am Carboxyterminus gelegenen Aminosäurerest enthalten.

Nachteilig an der Acetylierung von Peptiden ist, dass die Ionisierung durch die Einführung des Acetylrestes am aminoterminalen Ende der Peptide eine positive Ladung weniger als in einem Peptid mit einem intakten N-Terminus bewirken kann. Da grundsätzlich mehrfach geladene Peptide besser massenspektrometrisch detektiert werden können als einfach geladene, bewirkt die Acetylierung also einen Verlust an Sensitivität. Die durchgeführten Experimente zeigten ebenfalls, dass es auch zur Acetylierung der ϵ -Aminogruppe von Lysinresten kommen kann. Diese Acetylierung der ϵ -Aminogruppe von Lysinresten führt ebenfalls dazu, dass durch die Ionisierung eine positive Ladung weniger als im nicht chemisch durch Acetylierung modifizierten Peptid entstehen kann. Der einhergehende Verlust an Sensitivität gilt

aber in gleichem Maße für die zugrunde liegenden Peptide gleicher Aminosäureprimärsequenz aus den unterschiedlichen verwendeten Quellen, so dass es nicht zu einer messbaren Beeinflussung des inneren Verhältnisses zwischen den zugehörigen Signalen der sequenzgleichen, im einen Fall $^2\text{D}_3$ - und im anderen Fall $^1\text{H}_3$ -acetylierten Peptide kommt.

Identifizierung von MHC-Klasse-I-gebundenen Peptiden aus Gewebeproben von Darmtumor und Gewebeproben von den Tumor umgebendem, normalen Gewebe, unter Verwendung von $^2\text{D}_3$ - und $^1\text{H}_3$ -Acetylierung der MHC-Klasse-I-gebundenen Peptide in einer die relativen Mengen vergleichenden massenspektrometrischen Analyse auf Basis von Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS).

Peptide wurden wie beschrieben von MHC-Klasse-I-Molekülen einer Darmkrebsprobe (CCA129) und von MHC-Klasse-I-Molekülen einer Probe des den chirurgisch entfernten Tumor umgebenden Normalgewebes isoliert und im Anschluss durch $^2\text{D}_3$ - (Tumor) und $^1\text{H}_3$ - (normales Gewebe) Acetylierung chemisch modifiziert. Nach der chromatographischen Auftrennung der modifizierten Peptide durch microbore-HPLC wurden 19 Peptide wie beschrieben durch nano-ESI-MS identifiziert. Von diesen 19 Peptiden konnte für 17 wie beschrieben das relative mengenmäßige Verhältnis im Vergleich zwischen spezifischen Peptiden der Tumorgewebprobe zu den Peptiden der Probe normalen Gewebes mit der gleichen zugrunde liegenden Aminosäuresequenz bestimmt werden. Die Mehrzahl der identifizierten Peptide lag in beiden untersuchten Proben in ähnlichen Mengen vor ($^2\text{D}_3/^1\text{H}_3$ -Ratios zwischen 1.07 und 2.42). Insgesamt lag in der Tumorprobe die 1.7-fache Menge an Peptiden im Vergleich zur Normalgewebprobe vor. Zwei Peptide waren im

Tumorgewebe überrepräsentiert, ein Peptid war im Tumor unterrepräsentiert. Die statistische Auswertung der Ergebnisse unter Anwendung des "Student's t-test" bestätigte, dass nur die zwei überexprimierten- und das eine unterexprimierte Peptid außerhalb eines 99.99%igen Konfidenzintervalls von 0.87 bis 2.56 lagen.

Die zwei im Tumor überrepräsentierten Peptide stammen von den humanen Proteinen "ribosomal protein L24" und Beta-Catenin ab. Derweil wenig Daten bezüglich einer Tumor-Assoziation für das ribosomale Protein L24 existieren, wurde für das mit dem "ribosomal protein L24" verwandte "ribosomal protein L15" von Wang et al., 2001, Cloning and characterization of full-length human ribosomal protein L15 cDNA which was overexpressed in esophageal cancer, Gene 263:205-209, eine Rolle in der Entstehung von Speiseröhrenkrebs beschrieben. Für Beta-Catenin hingegen wurde eine Funktion als Onkogen, das durch Transaktivierung andere Onkogene, wie z.B. die Matrix-Metalloproteinase MMP-7, anschaltet, durch Ougolkov et al., 2002, Oncogenic beta-catenin and MMP-7 (matrilysin) cosegregate in late-stage clinical colon cancer, Gastroenterology 122: 60-71, beschrieben. Ein mutiertes Beta-Catenin-Peptid wurde von Robbins et al., 1996, A mutated beta-catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor-infiltrating lymphocytes, Journal of Experimental Medicine 183:1185-1192, als Zielstruktur in Verbindung mit dem menschlichen MHC-Allel HLA-A*24 für CD8-positive, den Hautkrebs infiltrierende T-Zellen beschrieben.

Verbesserte Ausbeute von MHC-Klasse-I-gebundenen Peptiden nach chemischer Modifikation der Peptide durch O-Methyl-iso-

Harnstoff-Hemisulfat und Nikotinyln-N-Hydroxy-Succinimid-Ester (NicNHS).

Die erstmalige und neue Verbindung zweier Methoden zur chemischen Modifikation von Peptiden durch Kombination der einheitlichen Guadinylierung von ϵ -Aminogruppen von Lysinresten in Peptiden durch O-Methyl-iso-Harnstoff-Hemisulfat und der Nikotinylierung der α -Aminogruppen der Peptide durch NicNHS führt zu einer deutlichen Verbesserung der Ionisierung von Peptiden (Fig. 4). Um die Entsalzung der chemisch modifizierten Peptide zu vereinfachen, wird die Nikotinylierung der Peptide wie beschrieben auf einer C18-Chromatographiesäule durchgeführt. Die durch die Nikotinylierung hervorgerufene, unerwünschte Modifikation der Seitenketten von Tyrosinresten konnte durch Behandlung der modifizierten Peptide mit Hydroxylamin wieder entfernt werden. Beispielhaft wird anhand des Peptides mit der Aminosäuresequenz AETSYVKL in Fig. 4 gezeigt, dass die Nikotinylierung des N-Terminus die Ionisierung in einer Weise beeinflusst, die dazu führt, dass nikotinylierte Peptide ebenso gut detektiert werden können, wie nicht chemisch modifizierte Peptide.

Identifizierung und Quantifizierung von MHC-Klasse-I-gebundenen Peptiden aus der Zelllinie Awells und der mit einem die cDNA des humanen Keratin 18 enthaltenden Plasmid transfizierten Zelllinie Awells durch Guadinylierung und 2D_4 -/ 1H_4 -Nikotinylierung der Peptide.

Durch Trask et al., 1990, Keratins as markers that distinguish normal and tumor-derived mammary epithelial cells, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87:2319-2323, war gezeigt worden, dass

Keratine sich als Marker für die Unterscheidung von Tumor- und gesundem Gewebe eignen. Um neue MHC-Klasse-I-gebundene Peptide aus humanem Keratin 18 zu identifizieren und um die differentielle Quantifizierung anhand eines beispielhaften Tumorantigens aufzuzeigen, waren Peptide aus der nicht-transfizierten (Awells) und aus der mit dem genannten Plasmid transfizierten Awells-Zelllinie (Awells Keratin 18) isoliert worden. Die isolierten Peptidgemische wurden im Anschluss wie beschrieben durch Guadinylierung und 2D_3 -, respektive 1H_3 -Nikotinylierung chemisch modifiziert. Die chemisch modifizierten Peptidgemische wurden miteinander gemischt und durch HPLC-MS-Analyse wie beschrieben untersucht. In einem zweiten Experiment wurde im MSMS-Modus gearbeitet, wodurch die Aminosäuresequenzen von insgesamt 27 verschiedenen Peptiden bestimmt werden konnten. Alle 27 gefundenen Peptide mit Ausnahme eines Peptids mit einem Molekulargewicht von 1091,6 Da wurden sowohl auf transfizierten, als auch auf nicht-transfizierten Zellen in Mengen detektiert, die innerhalb des Konfidenzintervalls von 0.64 bis 2.28 lagen (statistische Auswertung unter Anwendung des "Student's t-test"). Für das Peptid mit einem Molekulargewicht von 1091,6 Da wurde durch die MSMS-Analyse die Aminosäureabfolge RLASYLDRV bestimmt, welche ein Fragment der Aminosäuresequenz von Keratin 18 darstellt. Die MSMS-Spektren, die zur Identifizierung des Peptids mit der Sequenz RLASYLDRV geführt haben, sind in Fig. 3D abgebildet. Für das Peptid RLASYLDRV konnte kein Signal detektiert werden, das mit einer chemischen Modifizierung der Primärsequenz mit einem 1H_3 -Nikotinyrest hätte in Verbindung gebracht werden können. Diese Beobachtung legt nahe, dass Keratin 18 exklusiv in den Awells Keratin 18-Zellen exprimiert wurde. Das Signal für das Peptid RLASYLDRV mit einem

$^2\text{D}_3$ -Nikotinylnrest hingegen wurde sechsfach stärker als der Hintergrund exprimiert.

Die beschriebene Methode der Guadinylierung und Nikotinylierung von Peptiden unter Verwendung der zwei Wasserstoff-Isotope ^1H und ^2D erlaubt erstmals die schnelle und exakte Bestimmung von relativen quantitativen Unterschieden zwischen sequenzgleichen Peptiden aus zwei oder mehr unterschiedlichen Quellen. Durch Anwendung des Verfahrens zur Guadinylierung und Nikotinylierung von Peptiden auf Proben von Tumorgewebe und normalem Gewebe desselben Organs, oder durch Anwendung besagten Verfahrens auf Zelllinien, die zuvor durch für Onkogene oder andere Tumor-assoziierte Genprodukte kodierende Nukleinsäuren transfiziert worden sind, können tumor-assoziierte Peptidantigene bestimmt werden, die für die Herstellung von Impfstoffen zur Krebstherapie besonders geeignet sind.

In den Tabellen 1 bis 3 sind die oben beschriebenen Ergebnisse zusammengefasst, Tabelle 4 zeigt die Zuordnung der gefundenen Peptide zu dem Quellprotein und gibt ihre zugehörige SEQ-ID Nr. aus dem Sequenzprotokoll an, das Sequenzprotokoll zeigt die erfindungsgemäßen Peptide.

Sequenzprotokoll

<110> Immatics Biotechnologies GmbH

<120> Verfahren zur Identifizierung und Quantifizierung von tumor-
assoziierten Peptiden

<130> 4648P105

<160> 36

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Thr Thr Glu Gln His Gly Ala Arg Tyr
1 5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Phe Thr Lys Val Lys Pro Leu Leu

1 5
<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3
Val Ala Val Gly Val Ala Arg Ala Arg
1 5

<210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4
Asp Val Ser His Thr Val Val Leu Arg
1 5

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5
Thr Leu Gly Asp Ile Val Phe Lys Arg
1 5

<210> 6
<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Asp Ile His His Lys Val Leu Ser Leu
1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Glu Val Thr Arg Ile Leu Asp Gly Lys
1 5

<210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Arg Val Ala Pro Glu Glu His Pro Val Leu
1 5 10

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Glu Ala Gly Pro Ser Ile Val His Arg
 1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Glu Ser Thr Gly Ser Ile Ala Lys Arg
 1 5

<210> 11

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Gln Ile Thr Arg
 1 5 10

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Asp Ala Ala His Pro Thr Asn Val Gln Arg
 1 5 10

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Ala Glu Ser Leu Leu Thr Met Glu Tyr
1 5

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Leu Leu Met Glu His Thr Met Val Ala Phe
1 5 10

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

His Leu Ala Val Glu Arg Gly Lys Val
1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Ser Glu Ile Glu Ala Lys Val Arg Tyr
1 5

<210> 17

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Thr Leu Phe Pro Gly Lys Val His Ser Leu
1 5 10

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Ser Glu Asp Asn Arg Ile Leu Leu Trp
1 5

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Ser Ile Ile Gly Arg Leu Leu Glu Val

1

5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Gln Leu Val Asp Ile Ile Glu Lys Val
1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Ala Leu Leu Asp Lys Leu Tyr Ala Leu
1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Ile Met Leu Glu Ala Leu Glu Arg Val
1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Ala Glu Lys Leu Ile Thr Gln Thr Phe
1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Arg Leu Ala Gln His Ile Thr Tyr Val
1 5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Ser Glu Pro Asp Phe Val Ala Lys Phe
1 5

<210> 26

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Thr Glu Val Thr Gly His Arg Trp
1 5

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Ala Glu Thr Pro Asp Ile Lys Leu Phe
1 5

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Gln Glu His Val Lys Ser Phe Ser Trp
1 5

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Glu Glu Pro Thr Val Ile Lys Lys Tyr
1 5

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Gln Glu Ala Gly Ile Lys Thr Ala Phe
1 5

<210> 31

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Gly Glu Ala Ser Arg Leu Ala His Tyr
1 5

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

Gln Glu Asp Leu Arg Thr Phe Ser Trp
1 5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Met Glu Gln Val Ile Phe Lys Tyr Leu
1 5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Arg Leu Ala Ser Tyr Leu Asp Arg Val
1 5

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Ile Glu His Gly Ile Ile Thr Asn Trp
1 5

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

Thr Thr Ala Glu Arg Glu Ile Val Arg
1 5

Tabelle 1 zeigt die Messwerte massenspektrometrischer Signalintensitäten aus einer äquimolaren Mischung von $^2\text{D}_3$ -nikotinylierten Peptiden zu $^1\text{H}_3$ -nikotinylierten Peptiden aus MGAR-Zellen und die abgeleiteten Verhältnisse von $^2\text{D}_3$ -nikotinylierten Peptiden zu $^1\text{H}_3$ -nikotinylierten Peptiden mit jeweils gleichen zugrunde liegenden Aminosäuresequenzen. Peptide mit doppelter positiver Ladung $[\text{M}+\text{H}]^{2+}$ zeigen eine dramatisch höhere Signalintensität, als Peptide mit einfacher positiver Ladung $[\text{M}+\text{H}]^+$. Peptid-Ionen mit doppelt positiver Ladung ($[\text{M}+\text{H}]^{2+}$) haben andere zugrunde liegende Sequenzen, als Peptide mit einfacher positiver Ladung ($[\text{M}+\text{H}]^+$).

| Peptid-Ionisierungs-zustand | m/z-Verhältnis $^1\text{H}_3$ -acetylierter Peptid-Ionen | $^1\text{H}_3$ -Peptid-Signale [gezählte Ionen] | $^2\text{D}_3$ - Peptid-Signale [gezählte Ionen] | $^2\text{D}_3/^1\text{H}_3$ -Ratio |
|-----------------------------|--|--|---|------------------------------------|
| $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ | 554.45 | 409 | 361 | 0.88 |
| | 567.99 | 590 | 511 | 0.86 |
| | 574.50 | 316 | 306 | 0.96 |
| | 578.52 | 884 | 877 | 0.99 |
| | 582.01 | 615 | 598 | 0.97 |
| | 597.96 | 612 | 800 | 1.30 |
| | 604.95 | 499 | 558 | 1.11 |
| | 612.49 | 515 | 502 | 0.97 |
| $[\text{M}+\text{H}]^+$ | 941.49 | 33 | 32 | 0.97 |
| | 992.51 | 39 | 51 | 1.30 |
| | 1028.55 | 23 | 20 | 0.87 |
| | 1039.47 | 21 | 22 | 1.04 |
| | 1057.56 | 30 | 32 | 1.06 |
| | 1083.48 | 63 | 63 | 1.00 |
| | 1092.47 | 59 | 54 | 0.92 |
| | 1170.47 | 77 | 70 | 0.90 |
| Mittelwert | | | | 1.01 |
| Standardabweichung | | | | ± 0.13 |

Table 2: Zeigt Sequenzen und Messergebnisse für natürliche, von HLA-Klasse-I-Molekülen gewonnene Peptide aus Tumorgewebe und gesundem Gewebe eines Patienten mit Darmkrebs. Zur Durchführung der Analyse wurden die aus den Gewebeproben isolierten Peptide mit $^2\text{D}_6$ -Essigsäureanhydrid (Tumorgewebe), beziehungsweise $^1\text{H}_6$ -Essigsäureanhydrid (gesundes Gewebe) chemisch modifiziert, gemischt, verfahrensgemäß durch massenspektrometrische Analyse identifiziert und die zwischen den Gewebeproben bestehenden mengenmäßigen Verhältnisse von Peptiden mit identischen Aminosäuresequenzen durch Bestimmung der $^2\text{D}_3/^1\text{H}_3$ -Ratio quantifiziert. Um signifikante Über- beziehungsweise Unterrepräsentation von identifizierten und quantifizierten Peptiden festzustellen, werden die Messergebnisse ($^2\text{D}_3/^1\text{H}_3$ -Ratio) einer statistischen Auswertung (Student's t-test) unterzogen.

| Peptide Sequence (HLA anchor residues in bold) | HLA | Protein source | AA- Position | Ratio ($^2\text{D}_3/^1\text{H}_3$) |
|--|------|---|-----------------|--|
| T T E Q H G A R Y | A*01 | Tapasin | 372-380 | n.d. |
| F T K V K P L L | B*08 | Myosin heavy chain, nonmuscle A | 831-838 | n.d. |
| V A V G V A R A R | A*68 | Poly IG receptor | 656-664 | 0.69 |
| D V S H T V V L R | A*68 | Translocon-associated protein β -SU | 88-96 | 1.07 |
| T L G D I V F K R | A*68 | Fatty acid-binding protein, liver | 114-122 | 1.14 |
| D I H H K V L S L | B*08 | Ras-GAP SH3 binding protein 2 | 60-68 | 1.30 |
| E V T R I L D G K | A*68 | SH3BGR3-like protein | 23-31 | 1.32 |
| R V A P E E H P V L | n.a. | Actin, cytoplasmic 1 | 94-103 | 1.39 |
| T T A E R E I V R | A*68 | Actin alpha | 204-212 | 1.45 |
| S I F D G R V V A K | A*68 | Putative membrane protein (PNAS10) | 88-97 | 1.45 |
| E A G P S I V H R | A*68 | Actin alpha | 366-374 | 1.51 |
| D T A A Q I T Q R | A*68 | MHC class I antigen (HLA-B) | 136-144 | 1.61 |
| D T I E I I T D R | A*68 | HNRP A2/B1 | 139-147 | 1.66 |
| E S T G S I A K R | A*68 | Aldolase A | 34-42 | 1.73 |
| A V A A V A A R R | A*68 | Glucosidase II alpha subunit | 3-11 | 1.91 |
| T A A D T A A Q I T R | A*68 | MHC class I antigen (HLA-B) | 133-144 | 2.19 |
| E S G P S I V H R | A*68 | Actin beta | 364-372 | 2.42 |
| D A A H P T N V Q R | A*68 | Beta-catenin | 115-124 | 3.02 |
| S L A D I M A K R | A*68 | Ribosomal protein L24 | 86-94 | 3.27 |
| Mean value | | | | 1.71 |
| Standard deviation | | | | ± 0.68 |
| Student-t test: Confidence interval 99.99 % (n = 27) | | | | 0.87 - 2.56 |

n.a., not assigned; n.d., not determined

Tabelle 3 zeigt Sequenzen und Messergebnisse für natürliche, von HLA-Klasse-I-Molekülen gewonnene Peptide aus der nicht-veränderten Zelllinie Awells und der wie beschrieben durch Transfektion mit Keratin 18 genetisch veränderten Zelllinie Awells. Aus den genannten zwei Quellen Awells und Awells Keratin 18 isolierte Peptide wurden durch chemische Modifikation mit $^1\text{H}_4$ -Nikotinyresten (Awells) oder $^2\text{D}_4$ -Nikotinyresten (Awells Keratin 18) verändert. Verfahrensgemäß wurden die Peptide nach Beendigung der chemischen Modifikation gemischt und durch massenspektrometrische Analyse identifiziert und die zwischen Awells und Awells Keratin 18 bestehenden mengenmäßigen Verhältnisse von Peptiden mit identischen Aminosäuresequenzen durch Bestimmung der $^2\text{D}_4/{}^1\text{H}_4$ -Ratio quantifiziert. Um signifikante Über- beziehungsweise Unterrepräsentation von identifizierten und quantifizierten Peptiden festzustellen, werden die Messergebnisse ($^2\text{D}_3/{}^1\text{H}_3$ -Ratio) einer statistischen Auswertung (Student's t-test) unterzogen.

| Peptide Sequence (HLA anchor residues in bold) | HLA | Source protein | AA- Position | Ratio ($^2\text{D}_4/{}^1\text{H}_4$) |
|--|------|--|-----------------|--|
| K E S T L H L V L | B*44 | Ubiquitin | 63-71 | 0.96 |
| A E S L L T M E Y | B*44 | KIAA1390 | 31-39 | 1.02 |
| L L M E H T M V A F | A*02 | EST | 24-33 | 1.05 |
| H L A V E R G K V | A*02 | Similar to x-kinase | 532-540 | 1.06 |
| S E I E A K V R Y | B*44 | Talin I | 290-298 | 1.08 |
| T L F P G K V H S L | A*02 | WD-repeat protein 6 | 432-441 | 1.09 |
| S E D N R I L L W | B*44 | Methylosome protein 50 | 187-195 | 1.10 |
| S I I G R L L E V | A*02 | Phosphatase PP1- α 1 | 11-19 | 1.12 |
| Y L L P A I V H I | A*02 | RNA-dependent helicase p68 | 148-156 | 1.12 |
| Q L V D I I E K V | A*02 | Proteasome activator complex SU 3 | 114-122 | 1.14 |
| A L L D K L Y A L | A*02 | Similar to mitochon. ribosom. prot. S4 | 78-86 | 1.14 |
| I E H G I I T N W | B*44 | Actin alpha skeletal muscle | 73-81 | 1.19 |
| I M L E A L E R V | A*02 | Small nuclear ribonucleoprotein G | 68-76 | 1.19 |
| L L F D R P M H V | A*02 | HNRP M | 268-276 | 1.22 |
| A E K L I T Q T F | B*44 | NPD011 | 2-10 | 1.23 |
| R L A Q H I T Y V | A*02 | Licensing factor MCM7 | 532-540 | 1.25 |
| S E P D F V A K F | B*44 | FLJ20671 | 121-129 | 1.28 |
| T E V T G H R W | B*44 | Basigin | 48-55 | 1.37 |
| A E T P D I K L F | B*44 | 40S ribosomal protein S5 | 12-20 | 1.48 |
| Q E H V K S F S W | B*44 | Sortilin-related receptor | 245-253 | 1.50 |
| A I V D K V P S V | A*02 | Coatomer gamma subunit | 147-155 | 1.52 |
| E E P T V I K K Y | B*44 | Sorting nexin 5 | 257-265 | 1.54 |
| Q E A G I K T A F | B*44 | Multifunctional protein ADE2 | 69-77 | 1.60 |
| G E A S L R L A H Y | B*44 | Histone H2B.f | 75-83 | 1.65 |
| Q E D L R T F S W | B*44 | Ras-GTPase-activating protein | 243-251 | 1.66 |
| M E Q V I F K Y L | B*44 | Actin-like protein 3 | 93-101 | 1.98 |
| R L A S Y L D R V | A*02 | Cytokeratin 18 | 89-97 | ≥ 5.95 |
| Mean value | | | | 1.46 |
| Standard deviation | | | | ± 0.93 |
| Student-t test: Confidence interval 99.99 % (n = 27) | | | | 0.64 - 2.28 |

Tabelle 4 zeigt die Sequenzen, das Quellprotein beziehungsweise -gen, die relative Position des Peptides innerhalb des Quellproteins durch Angabe der Aminosäurepositionen, die GenBank-Accession-Nummern und die zu den jeweiligen Sequenzen gehörigen SEQ-ID Nr.:

| | Sequenz | Position/Genart | Acc. Nr. | SEQ ID-Nr. |
|-----|-------------|--|-----------|---------------|
| 1. | TTEQHGARY | 372-380 Tapasin | NP_003181 | SEQ ID-Nr. 1 |
| 2. | FTKVKPLL | 831-838 Myosin heavy chain, nonmuscle A | NP_002464 | SEQ ID-Nr. 2 |
| 3. | VAVGVARAR | 656-664 Poly IG receptor | NP_002635 | SEQ ID-Nr. 3 |
| 4. | DVSHTVVLR | 88-96 (NVSHTVVLR deamidiert) Translocon-associated protein, beta subunit | NP_003136 | SEQ ID-Nr. 4 |
| | TLGDIVFKR | 114-122 Fatty acid-binding protein, liver | NP_001434 | SEQ ID-Nr. 5 |
| 6. | DIHHKVLSL | 60-68 Ras-GAP SH3 binding protein 2 | NP_036429 | SEQ ID-Nr. 6 |
| 7. | EVTRILDGK | 23-31 SH3BGR3-like protein | NP_112576 | SEQ ID-Nr. 7 |
| 8. | RVAPEEHPVL | 95-104 Actin, cytoplasmic 1 | NP_001092 | SEQ ID-Nr. 8 |
| 9. | EAGPSIVHR | 366-374 Actin alpha | NP_005150 | SEQ ID-Nr. 9 |
| 10. | ESTGSIKR | 35-43 Aldolase A | NP_000025 | SEQ ID-Nr. 10 |
| | TAADTAAQITR | 133-143 MHC class I antigen (HLA-B) | BAA84116 | SEQ ID-Nr. 11 |
| 12. | DAAHPTNVQR | 115-124 Beta-catenin | NP_001895 | SEQ ID-Nr. 12 |
| 13. | AESLLTMEY | 31-39 KIAA1390 | BAA92628 | SEQ ID-Nr. 13 |
| 14. | LLMEHTMVAF | 470-461 EST (rf-1) | BG752065 | SEQ ID-Nr. 14 |
| 15. | HLAVERGKV | 532-540 x-kinase | AAM91924 | SEQ ID-Nr. 15 |
| 16. | SEIEAKVRY | 290-298 Talin 1 | NP_006280 | SEQ ID-Nr. 16 |
| 17. | TLFPGKVHSL | 432-441 WD-repeat protein 6 | NP_060501 | SEQ ID-Nr. 17 |
| 18. | SEDNRILLW | 187-195 | NP_077007 | SEQ ID-Nr. 18 |

| | | | | |
|-----|------------|--|-----------|---------------|
| 19. | SIIGRLLEV | Methylosome protein 50 11-19 Serine/threonine protein phosphatase PP1-alpha 1 | NP_002699 | SEQ ID-Nr. 19 |
| 20. | QLVDIIEKV | 114-122 Proteasome activator complex subunit 3 | NP_005780 | SEQ ID-Nr. 20 |
| 21. | ALLDKLYAL | 78-86 Similar to mitochondrial ribosomal protein S4 | NP_060755 | SEQ ID-Nr. 21 |
| 22. | IMLEALERV | 68-76 Small nuclear ribonucleoprotein G | NP_003087 | SEQ ID-Nr. 22 |
| 23. | AEKLITQTF | 2-10 NPD011 | AAG44476 | SEQ ID-Nr. 23 |
| | RLAQHITYV | 532-540 DNA replication licensing factor MCM7 | NP_005907 | SEQ ID-Nr. 24 |
| 25. | SEPDFVAKF | 121-129 FLJ20671 | NP_060394 | SEQ ID-Nr. 25 |
| 26. | TEVTGHRW | 164-171 Basigin | NP_001719 | SEQ ID-Nr. 26 |
| 27. | AETPDIKLF | 12-20 40S ribosomal protein S5 | NP_001000 | SEQ ID-Nr. 27 |
| 28. | QEHVKSFSW | 245-253 Sortilin-related receptor | NP_003096 | SEQ ID-Nr. 28 |
| 29. | EEPTVIKKY | 257-265 Sorting nexin 5 | NP_055241 | SEQ ID-Nr. 29 |
| | QEAGIKTAF | 69-77 Multifunctional protein ADE2 | NP_006443 | SEQ ID-Nr. 30 |
| 31. | GEASRLAHY | 76-84 Histone H2B.f | NP_066406 | SEQ ID-Nr. 31 |
| 32. | QEDLRTEFSW | 243-251 Ras-GTPase-activating protein | NP_005745 | SEQ ID-Nr. 32 |
| 33. | MEQVIFKYL | 93-101 Actin-like protein 3 | NP_005712 | SEQ ID-Nr. 33 |
| 34. | RLASYLDRV | 90-98 Cytokeratin 18 | NP_000215 | SEQ ID-Nr. 34 |
| 35. | IEHGIITNW | 73-81 Actin, alpha skeletal muscle | NP_001091 | SEQ ID-Nr. 35 |
| 36. | TTAEREIVR | 204-212 Actin, alpha skeletal muscle | NP_001091 | SEQ ID-Nr. 36 |

Patentansprüche

1. Verfahren zur Identifizierung und Quantifizierung von tumor-assoziierten Peptiden, mit den Schritten:

Bereitstellen einer ersten Probe von Gewebe oder Zellen,

Bereitstellen einer zweiten Probe von Gewebe oder Zellen mit der gleichen Gewichtsmenge bzw. Zellzahl wie die erste Probe,

Gewinnung von Peptiden aus der ersten und der zweiten Probe,

getrennte, chemisch identische Modifizierung der Peptide aus beiden Proben zur Erzeugung unterschiedlicher physikalischer Eigenschaften bei den Peptiden aus den verschiedenen Proben,

Mischen der so modifizierten Peptide aus beiden Proben,

Bestimmung der Aminosäuresequenzen der Peptide, und

Bestimmung der relativen mengenmäßigen Verhältnisse sequenzidentischer Peptide aus den beiden Proben anhand der unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Peptide aus den beiden Proben unter Verwendung von mindestens zwei verschiedenen stabilen Isotopen des selben Elements chemisch modifiziert werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, gekennzeichnet durch die folgenden Schritte:
 - a) Bereitstellung einer Probe aus tumorösem und einer Probe aus korrespondierendem gesunden Gewebe oder entsprechend transfizierten bzw. infizierten Zelllinien, wobei beide Proben gleiche Gewichtsmengen oder Zellzahlen aufweisen,

- b) Isolation von Peptiden aus der Probe aus tumorösem Gewebe,
 - c) Isolation von Peptiden aus der Probe aus korrespondierendem gesunden Gewebe,
 - d) Chemische Veränderung der aus Schritt (b) gewonnenen Peptide mit einer chemischen Gruppe, die ein stabiles Isotop eines Elements aus dem Periodensystem der Elemente enthält,
 - e) Chemische Veränderung der aus Schritt (c) gewonnenen Peptide mit einer chemischen Gruppe, die ein zweites stabiles Isotop des in Schritt d) verwendeten Elementes aus dem Periodensystem der Elemente enthält, wobei das in diesem Schritt verwendete stabile Isotop leichter oder schwerer als das in Schritt d) verwendete Isotop ist,
 - f) Mischung der aus den Schritten (d) und (e) gewonnenen, chemisch modifizierten Peptide,
 - g) Trennung der aus Schritt f) gewonnenen Peptide durch chromatographische Verfahren,
 - h) Identifizierung und Bestimmung von Peptiden mit identischen Aminosäuresequenzen und der mengenmäßigen Verhältnisse der chemisch veränderten Peptiden mit identischen Aminosäuresequenzen aus Schritt (g),
 - i) Identifizierung von tumor-assoziierten Peptiden mit Eignung für die Zusammenstellung eines therapeutischen Impfstoffes auf Grundlage der aus Schritt (h) gewonnenen Daten.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die tumor-assoziierten Peptide MHC-Klasse-I-Liganden sind.
5. Verfahren nach Anspruch 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt d) als stabiles Isotop Deuterium (^2D) und in Schritt e) normaler Wasserstoff (^1H) verwendet werden.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt g) eine chromatographische Trennung der Peptide durch HPLC ausgeführt wird.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass Schritt h) durch massenspektrometrische Analyse erfolgt.

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die massenspektrometrische Analyse zur Bestimmung der mengenmäßigen Verhältnisse zweier Peptide mit identischer Aminosäuresequenz und identischer chemischer Modifikation anhand von mindestens zwei unterschiedlichen Isotopen des selben Elements aus dem Periodensystem der Elemente durchgeführt wird.
9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die relative Intensität von gemessenen Signalen für Peptide identischer Aminosäuresequenz und identischer chemischer Modifikation bei gleichzeitig vorliegenden unterschiedlichen Isotopen desselben Elements zur Berechnung des relativen quantitativen Verhältnisses zwischen genannten Peptiden dient.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt i) geeignete Datenbanken zur Identifikation von tumorassoziierten Genen und Genprodukten verwendet werden.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass nach Schritt h) ein zusätzlicher Schritt durchgeführt wird, bei dem die Reaktivität von peripheren Leukozyten, vorzugsweise von T-Lymphozyten, gegen die identifizierten und quantifizierten Peptide getestet wird.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Reaktivitätstestung durch die Messung der von Leukozyten synthetisierten Zytokin-mRNA und/oder Interferon-mRNA erfolgt.
13. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass das Testen der Reaktivität durch die Aktivierung peripherer T-Lymphozyten vermittelt rekonstituierter Komplexe aus antigenpräsentierenden Molekülen und Peptiden erfolgt.
14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass die zur Aktivierung von T-Lymphozyten verwendeten Komplexe aus antigenpräsentierenden Molekülen und Peptiden auf einer Oberfläche fixiert werden.

15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass die zur Fixierung der Komplexe aus antigenpräsentierenden Molekülen und Peptiden verwendete Oberfläche aus Polystyrol besteht.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass die antigenpräsentierenden Moleküle durch chemische Reaktion mit Biotin verknüpft sind und die verwendete Oberfläche aus Polystyrol durch chemische Reaktion mit Streptavidin beschichtet ist.
17. Verfahren zur Herstellung eines Peptids, bei dem nach dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16 ein Peptid identifiziert und das identifizierte Peptid chemisch, in vitro oder in vivo synthetisiert wird.
18. Peptid, das durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16 identifiziert und/oder durch ein Verfahren nach Anspruch 17 hergestellt wurde.
19. Tumor-assoziiertes Peptid mit einer Aminosäuresequenz, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID-Nr. 1 bis 36 aus dem beiliegenden Sequenzprotokoll, wobei das Peptid die Fähigkeit aufweist, an ein Molekül des menschlichen Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) Klasse-I zu binden.
20. Peptid nach Anspruch 18 oder 19, dadurch gekennzeichnet, dass zumindest eine Aminosäure durch eine andere Aminosäure mit ähnlichen chemischen Eigenschaften ersetzt ist.
21. Peptid nach einem der Ansprüche 18 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass N- oder C-terminal zumindest eine weitere Aminosäure vorhanden ist.
22. Peptid nach einem der Ansprüche 18 bis 21, dadurch gekennzeichnet, dass zumindest eine Aminosäure deletiert ist.
23. Peptid nach einem der Ansprüche 18 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass zumindest eine Aminosäure chemisch modifiziert ist.

24. Verwendung eines oder mehrerer der Peptide nach einem der Ansprüche 18 bis 23 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Tumorerkrankungen und/oder adenomatöser Erkrankungen.
25. Verwendung des Peptides nach einem der Ansprüche 18 bis 23 zur Behandlung von Tumorerkrankungen und/oder adenomatöser Erkrankungen.
26. Verwendung nach Anspruch 24 oder 25, dadurch gekennzeichnet, dass die Erkrankung Nieren-, Lungen-, Darm-, Magen-, Pankreas-, Brust-, Prostata-, Ovarial- und/oder Hautkrebs ist.
27. Verwendung nach einem der Ansprüche 24 bis 26, dadurch gekennzeichnet, dass das Peptid zusammen mit einem Adjuvans eingesetzt wird.
28. Verwendung nach einem der Ansprüche 24 bis 27, dadurch gekennzeichnet, dass ein Peptid gebunden auf einer anti-genpräsentierenden Zelle eingesetzt wird.
29. Verwendung des Peptides nach einem der Ansprüche 18 bis 23 zur Markierung von Leukozyten, insbesondere von T-Lymphozyten.
30. Verwendung des Peptides nach einem der Ansprüche 18 bis 23 zur Beurteilung eines Therapieverlaufes bei einer Tumorerkrankung.
31. Verwendung eines Peptides nach einem der Ansprüche 18 bis 23 zur Herstellung eines Antikörpers.
32. Pharmazeutische Zusammensetzung enthaltend eines oder mehrere der Peptide nach einem der Ansprüche 18 bis 23.
33. Nukleinsäuremolekül kodierend für das Peptid nach einem der Ansprüche 18 bis 23.

34. Vektor, umfassend das Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 33.
35. Zelle, die mit Hilfe des Nukleinsäuremoleküls nach Anspruch 33, oder mit dem Vektor nach Anspruch 34 genetisch derart verändert wurde, dass sie ein Peptid nach einem der Ansprüche 18 bis 23 exprimiert.
36. Verwendung des Nukleinsäuremoleküls aus Anspruch 33 und/oder des Vektors aus Anspruch 34 und/oder der Zelle aus Anspruch 35 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Tumorerkrankungen und/oder adenomatöser Erkrankungen.
37. Verfahren zur Herstellung eines Impfstoffes mit den Schritten:
 - a) Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 16,
 - b) Herstellung der identifizierten Peptide, und
Formulierung der hergestellten Peptide zu dem Impfstoff.
38. Diagnostisches Verfahren bei dem das Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16 durchgeführt und das Vorhandensein und/oder das mengenmäßige Verhältnis eines Peptides als diagnostischer Marker verwendet wird.
39. Verfahren zur Behandlung eines pathologischen Zustandes, bei dem eine Immunantwort gegen ein interessierendes Protein ausgelöst wird, dadurch gekennzeichnet, dass eine therapeutische wirksame Menge zumindest eines der Peptide nach einem der Ansprüche 18 bis 23 verabreicht wird.
40. Elektronisches Speichermedium, das die Aminosäuresequenz zumindest eines der Peptides nach einem der Ansprüche 18 bis 23 und/oder die Nukleinsäuresequenz des Nukleinsäuremoleküls nach Anspruch 33 enthält.

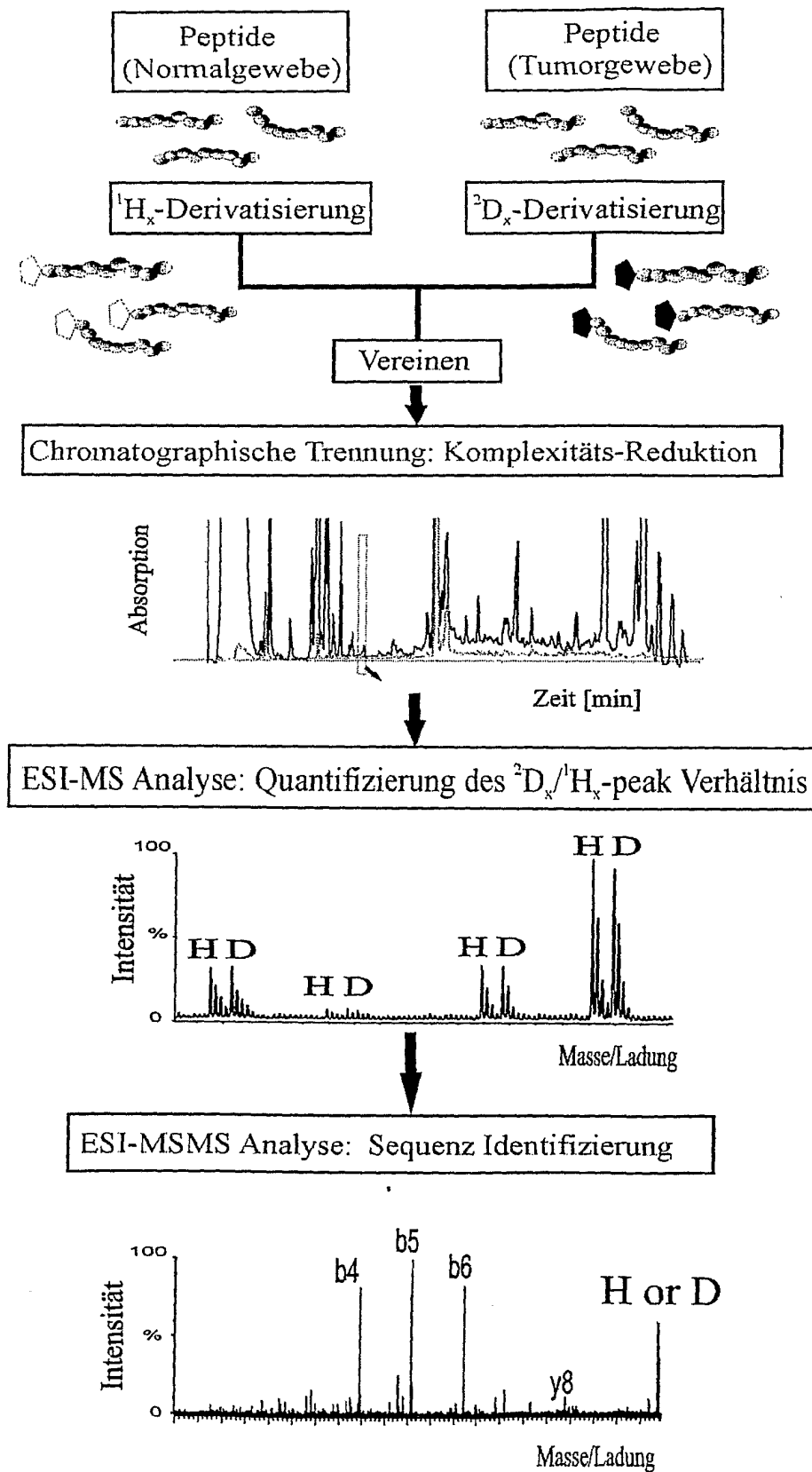
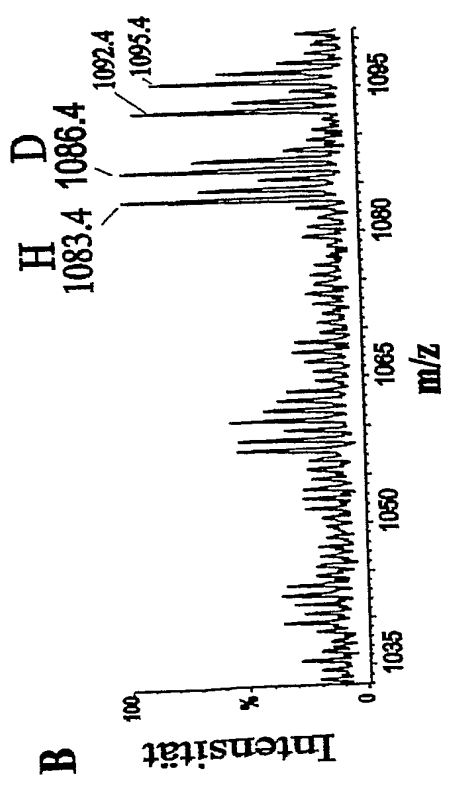
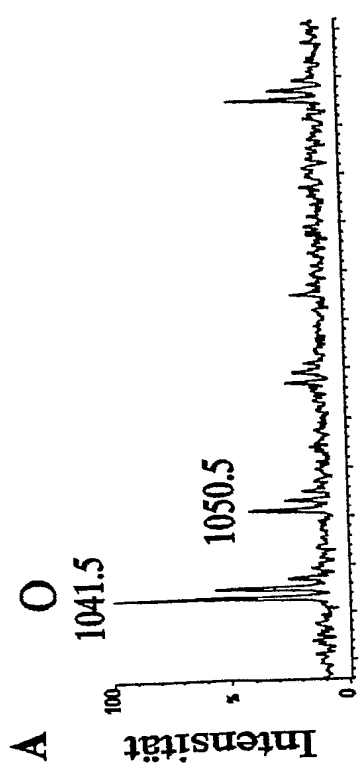


Fig. 1



O: ohne Derivatisierung
H: ¹H₃-Acetylierung
D: ²D₃-Acetylierung

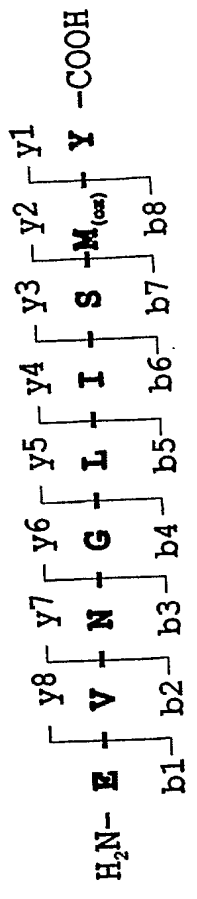
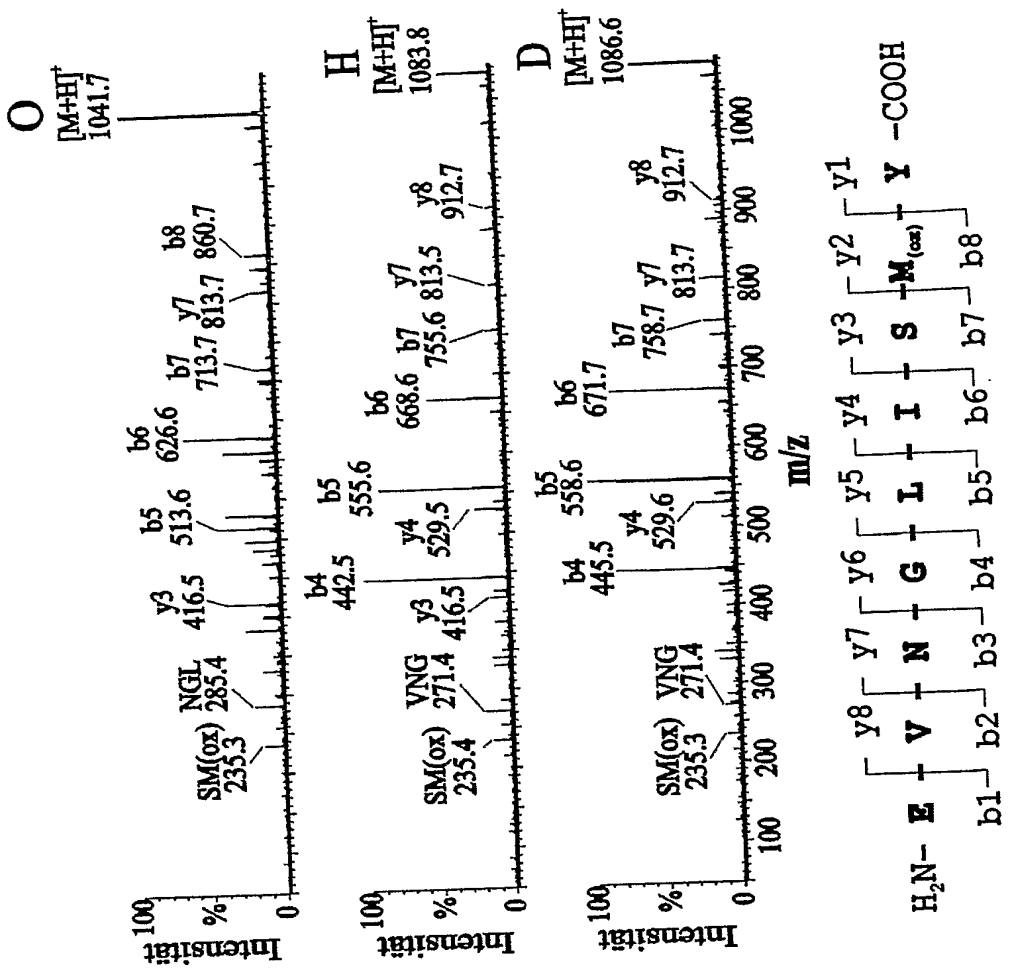


Fig. 2

Durchschnitts
Verhältnis:

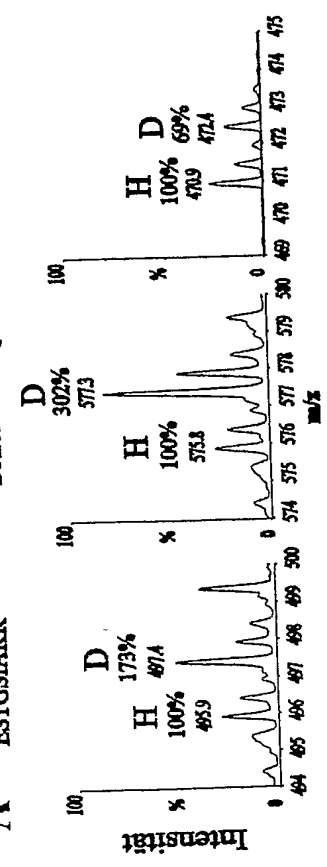
Höchstes
Verhältnis:

Niedrigstes
Verhältnis:

Aldolase A
ESTGSLAKR

Beta-catenin
DAAHPTNVQR

Poly IG receptor
VAVGVARAR



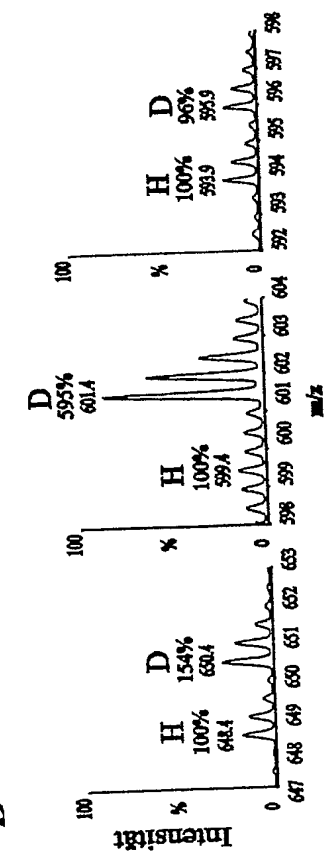
H: ¹H₃-Acetylierung

D: ²D₃-Acetylierung

Sorting nexin 5
REPTVIKKY

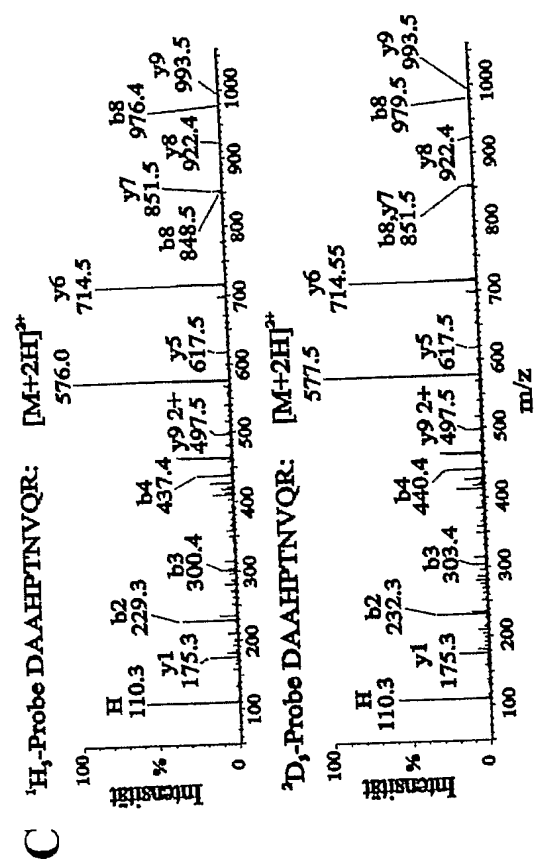
Keratin 18
RLASYLDRV

Ubiquitin
KESTLHLVL

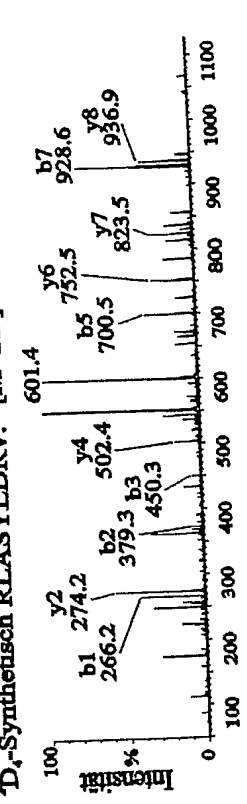


H: ¹H₂-Nicotinylierung

D: ²D₂-Nicotinylierung



D: ²D₃-Synthetisch RLASYLDRV: [M+2H]²⁺



D: ²D₄-Probe RLASYLDRV: [M+2H]²⁺

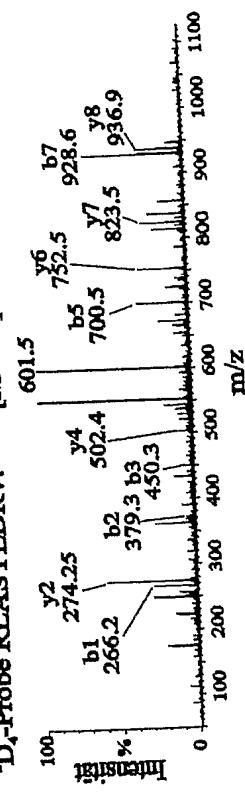


Fig. 3

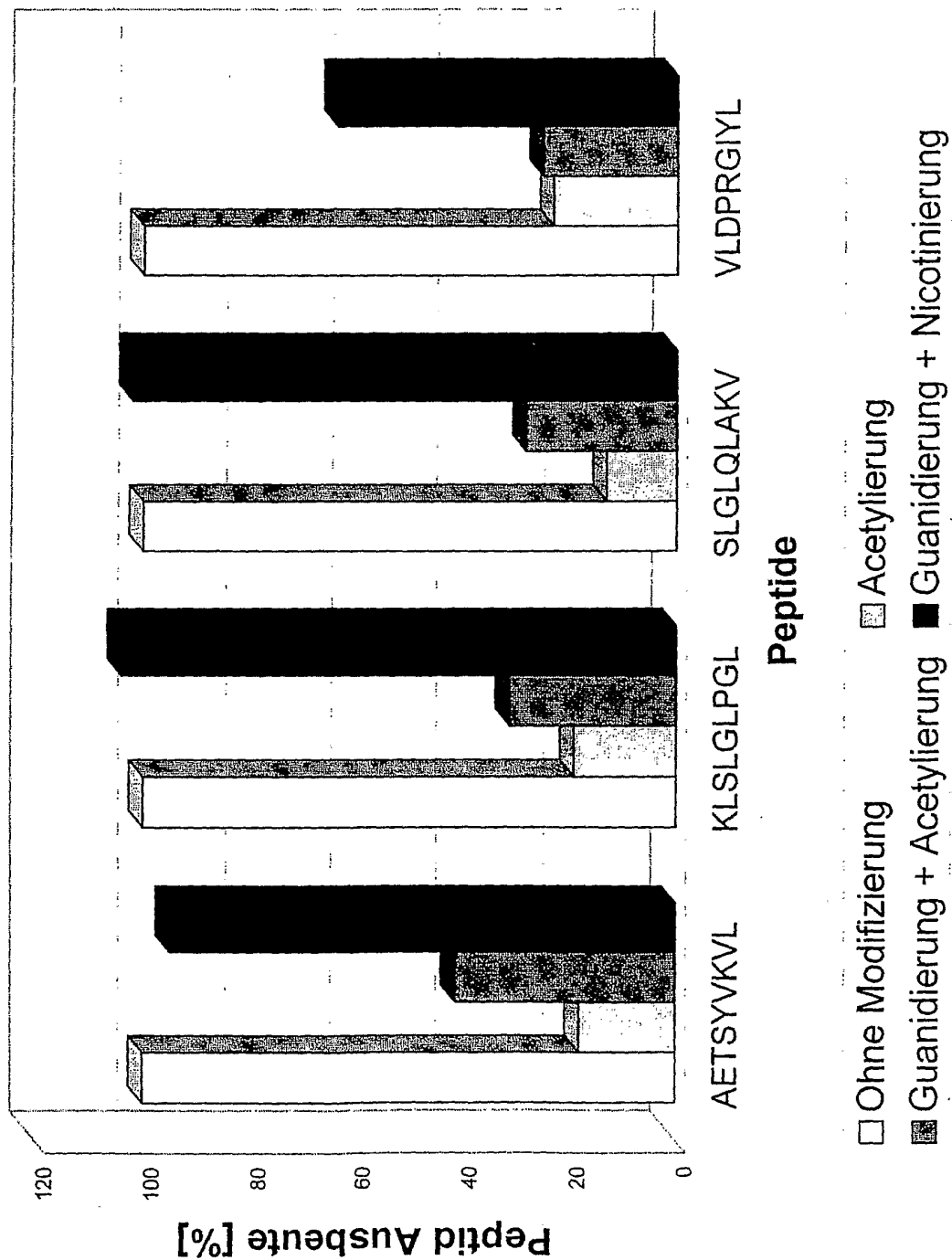


Fig. 4

Zusammenfassung

Beschrieben wird ein Verfahren zur Identifizierung und Quantifizierung von tumor-assoziierten Peptiden, wobei zunächst mindestens zwei verschiedene Quellen zur Gewinnung der Peptide bereitgestellt werden (Tumor- und gesundes Gewebe) und die Peptide aus den unterschiedlichen Quellen unter Verwendung mindestens zwei verschiedener stabiler Isotope desselben Elements getrennt voneinander in identischer Weise chemisch modifiziert werden. Anschließend werden die Peptide durch chromatographische Verfahren isoliert und die Aminosäuresequenzen der Peptide bestimmt, wobei die Bestimmung der relativen mengenmäßigen Verhältnisse sequenzidentischer Peptide aus verschiedenen Proben zueinander anhand der verwendeten stabilen Isotope in der chemischen Modifikation erfolgt. Des Weiteren betrifft die Erfindung ein tumor-assoziiertes Peptid mit einer Aminosäuresequenz, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus SEQ-ID Nr. 1 bis 36 aus dem beiliegenden Sequenzprotokoll, wobei das Peptid die Fähigkeit aufweist, an ein Molekül des menschlichen Haupthistokompatibilitäts-Komplexes (MHC) Klasse-I zu binden. Die Erfindung betrifft darüber hinaus die Verwendung der Peptide zur Herstellung eines Arzneimittels und zur Behandlung von Tumorerkrankungen und/oder adenomatöser Erkrankungen. Ferner wird eine pharmazeutische Zusammensetzung beschrieben, die mindestens eines der Peptide aufweist.